



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학박사 학위논문

전하 전환성 Poly(ethylene imine)-  
Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid)  
고분자의 합성 및 유전자, 약물  
전달체로서의 응용

Synthesis and Applications of Charge-Conversional  
Poly(ethylene imine)-Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid)  
Polymers for Gene and Drug Delivery Carriers

2017년 8월

서울대학교 대학원  
바이오시스템 · 소재학부  
바이오소재공학전공  
유 기 태

전하 전환성 Poly(ethylene imine)-  
Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid)  
고분자의 합성 및 유전자, 약물  
전달체로서의 응용

지도교수 김 태 일

이 논문을 농학박사 학위논문으로 제출함  
2017년 6월

서울대학교 대학원  
바이오시스템·소재학부  
바이오소재공학전공  
유 기 태

유기태의 박사 학위논문을 인준함  
2017년 7월

위 원 장      이 기 훈      (인)

부위원장      김 태 일      (인)

위      원      기 창 석      (인)

위      원      정 지 훈      (인)

위      원      강 한 창      (인)

## 초 록

본 연구에서는 폴리에틸렌이민 (poly(ethylene imine), PEI)을 개시제로, 라이신-N 카르복실무수물 (Lysine N-carboxyanhydride, Lys-NCA)과 글루탐산-N 카르복실무수물 (Glutamic acid N-carboxyanhydride, Glu-NCA)을 단량체로 이용하여 개환 중합을 통해 PEI-poly(L-lysine)-poly(L-glutamic acid) (PEI-Lys-Glu, PLG) 고분자를 합성하였다. 그리고 이 고분자를 이용하여 pH 감응성을 갖는 전하 전환성 확인과 유전자 및 약물 전달 시스템으로써의 응용을 살펴보았다.

PEI-Lys은 분자량 1,800 Da의 PEI 1분자 당 51.8개의 Lys 단량체가 합성되었다. 전하 전환성 부여를 위해 개환 중합을 통해 PEI-Lys 말단의 1차 아민으로부터 글루탐산 (Glu)을 추가로 도입하여 PEI-Lys-Glu (PLG) 고분자를 합성하였다.

$^1\text{H}$  NMR을 이용하여 PLG의 합성 여부를 확인한 결과 PLG의 Glu는 각각 53.4, 75.9, 93.7, 140.5개가 도입되었다. 전하 전환성 고분자는 pH 7.4, 6.0 조건, 혈청 단백질 유무에 관계없이 양호한 세포 대사 활성을 보였다. PLG 고분자는 자체로 입자성을 나타내었으며, PLG 고분자의 산-염기 적정 결과 글루탐산의 비율이 증가할수록 완충 효과가 크게 나타났다.

PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7 중 PLG1.8 고분자가 유전자 전달에 제일 적합하였으며, 이 고분자의 경우 transfection 실험 결과 약산성, 혈청 단백질이 존재하는 조건에서 중성 pH에서의 transfection 결과 값보다 91.8배 증가하였다. 그리고 bafilomycin A1을 이용한 transfection 실험 결과 엔도솜 탈출이 양성자 스폰지 효과에 의한 탈출임을 확인하였고 이것은 PEI의 2차, 3차 아민의 역할을 글루탐산이 대체하고 있다고 볼 수 있다. 또한 Apoptin을 발현하는 유전자와 Bcl-2 siRNA 등의 치료용 유전자를 이용하여 실제 암세포의 사멸 효과도 확인하였다.

한편 PEI로 개질된 환원성 산화그래핀 (PEI-rGO)은 PLG1.5의 코팅을 통

해 pH 감응성 및 전하 전환성을 부여하였다. 생체 pH에서 음의 표면 전하 값을 갖는 PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO는 코팅하지 않은 PEI-rGO에 비해 혈청 단백질에 대한 저항성을 보였다. 그리고 혈청 단백질이 있는 약산성 조건에서 향상된 세포 투과능을 보였고, 위 조건에서 MTT 실험을 통해 암 세포 사멸 효과가 증진되었음을 확인할 수 있었다.

PEI로 개질한 메틸셀룰로오스 (MCPEI)에 전하 전환성을 갖는 PLG1.0, PLG2.7을 함께 이용하여 독소루비신 (DOX) 전달 시스템을 구성하고 성능을 평가하였다. 음이온성 고분자인 PLG2.7을 이용하여 제조한 MCPEI 기반의 DOX 전달 시스템은 Polyion complex (PIC) 구조를 형성하였고, 산성 조건에서 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX에 비해 향상된 약물 방출량을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 HeLa 및 A549 세포에서 세포 대사 활성 감소 효과가 향상된 결과를 보였다.

따라서 본 연구는 전하 전환성 고분자인 PLG를 유전자 전달 시스템, PEI로 개질한 환원성 산화 그래핀, PEI로 개질한 메틸셀룰로오스 기반의 약물 전달 시스템에 사용하여 종양 조직의 pH 환경 및 혈청 단백질 조건에서 각각의 암세포 사멸 효과를 향상 시키는 결과를 도출하였다. 이를 기반으로 특정 환경에 대해 감응성을 갖는 지능형의 유전자 및 약물 전달체의 개발에 대한 연구에 기여할 것으로 기대한다.

**주요어 :** 전하 전환성 고분자, pH 감응성, 유전자 전달체, 약물 전달체, 산화 그래핀, 메틸셀룰로오스

**학 번 :** 2013-30340

# 목 차

초 록 .....	i
목 차 .....	iii
List of Tables .....	vii
List of Figures .....	viii
List of Abbreviations .....	xvi
제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 문헌 연구 .....	8
2.1 암 치료 목적의 유전자 및 약물 전달 시스템으로써의 고분자 .....	8
2.2 pH 감응성을 갖는 고분자를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 .....	11
2.2.1 암 세포 및 조직의 특성 .....	11
2.2.2 pH 감응성을 갖는 고분자와 이를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 .....	13
2.3 전하 전환성 고분자를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 .....	16
2.3.1 말레익산 아마이드 유도체를 이용한 전하 전환성 고분자와 전달 시스템으로의 응용 .....	16
2.3.2 폴리펩타이드를 이용한 전하 전환성 고분자와 전달 시스템 으로의 응용 .....	19
2.4 산화 그래핀과 메틸셀룰로오스를 이용한 유전자 및	

약물 전달 시스템 .....	23
2.4.1 의료용 소재로써의 산화 그래핀 및 메틸셀룰로오스의 특성 .....	23
2.4.2 산화 그래핀을 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 .....	25
2.4.3 메틸셀룰로오스를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템 ...	27
 제 3 장   재료 및 방법 .....	30
3.1 재 료 .....	30
3.2 실험방법 .....	31
3.2.1 전하 전환성 고분자의 합성 .....	31
3.2.1.1 개환 중합을 위한 단량체의 합성 .....	31
3.2.1.2 PLG의 합성 .....	31
3.2.2 전하 전환성 고분자의 특성 분석 .....	32
3.2.2.1 <sup>1</sup> H NMR을 이용한 구조 분석 .....	32
3.2.2.2 SEC를 이용한 분자량 측정 .....	32
3.2.2.3 PLG의 세포 대사 활성 확인 .....	33
3.2.2.4 PLG의 산-염기 적정 .....	34
3.2.2.5 PLG의 입자성 확인 .....	34
3.2.3 PLG를 이용한 유전자 전달 시스템으로써의 성능 평가 ...	35
3.2.3.1 PLG의 폴리플렉스 형성 확인 및 특성 분석 .....	35
3.2.3.2 PLG 폴리플렉스의 transfection 효율 평가 .....	37
3.2.3.3 PLG 폴리플렉스의 세포 투과율 평가 .....	38
3.2.3.4 치료용 유전자를 이용한 PLG 폴리플렉스의 암세포 사멸 효과 평가 .....	39
3.2.4 PLG를 코팅한 PEI 개질 산화 그래핀 (PEI-rGO) 약물 전달체의 성능 평가 .....	41
3.2.4.1 PEI-rGO의 DOX 담지 및 함량 확인 .....	41

3.2.4.2 PLG를 이용한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 코팅 및 특성 분석 .....	42
3.2.4.3 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 실험 .....	43
3.2.5 PLG를 이용한 PEI 개질 메틸셀룰로오스 (MCPEI) 기반 약물 전달 시스템의 성능 평가 .....	46
3.2.5.1 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 제조, 약물 담지 및 함량 확인 .....	46
3.2.5.2 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 특성 분석 ·	47
3.2.5.3 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자를 이용한 세포 실험 .....	48

## 제 4 장 결과 및 고찰 ..... 50

4.1 PLG의 합성 및 특성 분석 .....	50
4.1.1 PLG의 합성 .....	50
4.1.2 <sup>1</sup> H NMR을 이용한 PLG의 구조 분석 .....	53
4.1.3 SEC를 이용한 PLG의 분자량 확인 .....	59
4.1.4 PLG의 세포 대사 활성 확인 .....	59
4.1.5 PLG의 산-염기 적정 .....	67
4.1.6 PLG의 입자성 확인 .....	67
4.2 PLG를 이용한 유전자 전달 시스템 .....	73
4.2.1 PLG 폴리플렉스의 형성 및 특성 분석 .....	73
4.2.2 pH에 따른 PLG 폴리플렉스의 transfection 효율 평가 ...	82
4.2.3 pH와 혈청 단백질 유무에 따른 PLG 폴리플렉스의 세포 투과율 평가 .....	90
4.2.4 치료용 유전자를 이용한 PLG 폴리플렉스의 암세포 사멸 효과 평가 .....	98
4.3 PLG를 코팅한 PEI 개질 산화 그래핀 (PEI-rGO) 약물	



전달 시스템 .....	103
4.3.1 PEI-rGO의 DOX 담지 및 함량 확인 .....	103
4.3.2 PLG를 이용한 PEI-rGO의 코팅 및 PLG를 코팅한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 특성 분석 .....	105
4.3.3 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 암세포 사멸 효과 평가 .. .....	115
4.3.4 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 투과율 평가 .....	119
4.3.5 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 내 거동 관찰 ....	123
4.4 PLG를 이용한 PEI 개질 메틸셀룰로오스 (MCPEI) 기반 약물 전달 시스템 .....	131
4.4.1 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 제조, 약물 담 지 및 함량 확인 .....	131
4.4.2 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 특성 분석 ·	133
4.4.3 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체의 암세포 사멸 효과 평가 .....	139
4.4.4 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체의 세포 투과율 평가 ... .....	142
 제 5 장 결 론 .....	 148
 참고문헌 .....	 151
Abstract .....	171

## List of Tables

<b>Table 1.</b>	Feed ratio, glutamic acid ratio (Glu ratio), the number of glutamic acid (No. of Glu) and anion/cation ratio of PLG polymers. The anion/cation ratio was calculated as the ratio of all amine groups and carboxyl groups in the PLG polymers. All numbers are determined by $^1\text{H}$ NMR. ....	58
<b>Table 2.</b>	SEC results of PEI-Lys and PLG polymers. ....	60
<b>Table 3.</b>	Cellular uptake percentage of PLG1.8/YOYO-1 labeled pDNA polyplexes in HeLa cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates. ....	93
<b>Table 4.</b>	Cellular uptake percentage of PLG1.8/YOYO-1 labeled pDNA polyplexes in A549 cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates. ....	96
<b>Table 5.</b>	Cellular uptake percentage of PEI-rGO/DOX and PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates. ....	121
<b>Table 6.</b>	Cellular uptake percentage of PEI-rGO/DOX and PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates. ....	125
<b>Table 7.</b>	DOX loading profiles of MC, PEI25k, MCPEI and PLG polymers based DOX delivery systems. ....	132

# List of Figures

<b>Figure 1.</b> General structures of polymer-drug conjugate drug delivery carriers [8] .....	2
<b>Figure 2.</b> Electrically charged amino acids. Lysine, arginine, histidine, aspartate, glutamate. ....	6
<b>Figure 3.</b> Synthesis scheme of Lys(Z)-NCA and BGlu-NCA. ...	51
<b>Figure 4.</b> Synthesis scheme of PEI-Lys-Glu (PLG). ....	52
<b>Figure 5.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of (A) Lys(Z)-NCA and (B) BGlu-NCA. ....	54
<b>Figure 6.</b> $^1\text{H}$ NMR spectrum of PEI-Lys(Z). ....	55
<b>Figure 7.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7. ....	56
<b>Figure 8.</b> MTT assay results of PLG1.0 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ ) · .....	62
<b>Figure 9.</b> MTT assay results of PLG1.5 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ ) · .....	63
<b>Figure 10.</b> MTT assay results of PLG1.8 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ ) · .....	64
<b>Figure 11.</b> MTT assay results of PLG2.7 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ ) · .....	65

<b>Figure 12.</b> MTT assay results of PLG1.8 in A549 cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ ) ·	66
<b>Figure 13.</b> Acid-base titration of PLG polymers. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 (D) PLG2.7	68
<b>Figure 14.</b> Transmittance of PLG polymers. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8, (D) PLG2.7	70
<b>Figure 15.</b> Average sizes and zeta-potentials of PLG1.8 polymers with various pH conditions.	71
<b>Figure 16.</b> Schematics of PLG1.8 particle formation at (A) acidic, basic pH conditions, (B) neutral pH condition.	72
<b>Figure 17.</b> Agarose gel electrophoresis results of PLG polyplexes. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8, (D) PLG2.7.	74
<b>Figure 18.</b> (A) Agarose gel electrophoresis result of PLG1.8 polyplex at acidic condition (pH 5.0), (B) PicoGreen assay of PLG1.8 polyplex.	76
<b>Figure 19.</b> Schematics of PLG/pDNA polyplex formation.	77
<b>Figure 20.</b> Average sizes and zeta-potentials of PLG1.5 polyplexes with different pH conditions (pH 7.4, 6.0) at various weight ratios of polymer/pDNA (10, 20, 40, 60, 80, 100).	79
<b>Figure 21.</b> Average sizes and zeta-potentials of PLG1.8 polyplexes with different pH conditions (pH 7.4, 6.0) at various weight ratios of polymer/pDNA (10, 20, 40, 60, 80, 100).	80
<b>Figure 22.</b> Schematics of PLG1.8 polyplex at neutral and slightly acidic pH conditions.	81

- Figure 23.** Transfection experiment results of PLG1.5 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. .... 83
- Figure 24.** Transfection experiment results of PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05) ..... 84
- Figure 25.** Transfection experiment results of PLG1.8 polyplexes in A549 cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01) ..... 86
- Figure 26.** Transfection experiment results of PEI25k and PLG1.8 polyplexes with or without bafilomycin A1 in HeLa cells. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) (A) RLU/mg protein, (B) Relative luciferase expression (%) ..... 88
- Figure 27.** Transfection experiment results of PEI25k and PLG1.8 polyplexes with or without bafilomycin A1 in A549 cells. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01) (A) RLU/mg protein, (B) Relative luciferase expression (%) ..... 89
- Figure 28.** Flow cytometry results of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in HeLa cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 92

- Figure 29.** Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in HeLa cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). ..... 94
- Figure 30.** Flow cytometry results of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in A549 cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 95
- Figure 31.** Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in A549 cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). ..... 97
- Figure 32.** Anticancer activity evaluation by MTT assay with apoptin transfection experiment of PEI25k and PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. .... 99
- Figure 33.** Anticancer activity evaluation by MTT assay with Bcl-2 siRNA transfection experiment of PEI25k and PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. .... 100
- Figure 34.** (A) Absorbance spectrum of PEI-rGO (black line) and PEI-rGO/DOX (red line). (B) Fluorescence spectrum of PEI-rGO/DOX in water (black line) and 90% DMSO (red line). .... 104

<b>Figure 35.</b> Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7 coated PEI-rGO with various weight ratio (10, 20, 30, 50). .....	106
<b>Figure 36.</b> Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7 coated PEI-rGO with pH 7.4 and 6.0. The weight ratio between PLG polymers and PEI-rGO was set to 30. .....	108
<b>Figure 37.</b> Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.5 and (B) PLG1.8 coated PEI-rGO/DOX with pH 7.4 and 6.0. The weight ratio between PLG polymers and PEI-rGO/DOX was set to 30. ....	110
<b>Figure 38.</b> Schematics of PLG1.5 coated PEI-rGO at neutral and slightly acidic pH conditions. ....	111
<b>Figure 39.</b> EFTEM images of (A) PEI-rGO, (B) PLG1.5 coated PEI-rGO, (C) PEI-rGO/DOX, (D) PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX. (Scale bar = 0.5 $\mu$ m) ....	113
<b>Figure 40.</b> Serum stability experiment results of PEI-rGO and PLG1.5 coated PEI-rGO by using DLS. ....	114
<b>Figure 41.</b> DOX release profile of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX. .....	116
<b>Figure 42.</b> Anticancer activity evaluation by MTT assay of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. (mean $\pm$ SD, n = 3, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) ....	117
<b>Figure 43.</b> Anticancer activity evaluation by MTT assay of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells (A) without serum and (B) with serum. (mean $\pm$ SD, n = 3, *p < 0.05, ***p < 0.001) ....	118

- Figure 44.** Flow cytometry results of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in HeLa cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 120
- Figure 45.** Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in HeLa cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). .... 122
- Figure 46.** Flow cytometry results of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in A549 cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 124
- Figure 47.** Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in A549 cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). .... 126
- Figure 48.** Fluorescence microscopy images of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells with different pH and serum conditions (7.4, 6.0, and without serum, with serum). Scale bar = 50  $\mu$ m. .... 127
- Figure 49.** Fluorescence microscopy images of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells with different pH and serum conditions (7.4, 6.0, and without serum, with serum). Scale bar = 50  $\mu$ m. .... 128
- Figure 50.** Schematics of the PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX particles from blood vessel to cell penetration. .... 130



- Figure 51.** Z-Average sizes and zeta-potentials of MCPEI and MCPEI+charge conversion polymer based DOX delivery systems with pH 7.4, 6.0 and 5.0. (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/ DOX, (C) MCPEI+PLG2.7/DOX ..... 134
- Figure 52.** Schematics of MCPEI+PLG2.7/DOX particle at neutral and slightly acidic pH conditions. .... 136
- Figure 53.** DOX release profile of MCPEI and MCPEI+PLG polymers based DOX delivery systems. (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX, (C) MCPEI+PLG2.7/DOX ..... 138
- Figure 54.** Anticancer activity evaluation by MTT assay of (A) DOX only, (B) MCPEI/DOX, (C) MCPEI+PLG1.0/DOX and (D) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells with pH 7.4 (black bar) and 6.0 (red bar). .... 140
- Figure 55.** Anticancer activity evaluation by MTT assay of (A) DOX only, (B) MCPEI/DOX, (C) MCPEI+PLG1.0/DOX and (D) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells with pH 7.4 (black bar) and 6.0 (red bar). .... 141
- Figure 56.** Flow cytometry results of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells. The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 143
- Figure 57.** Mean fluorescence intensity of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells based on FACS results. .... 144
- Figure 58.** Flow cytometry results of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells. The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively. .... 145

**Figure 59.** Mean fluorescence intensity of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells based on FACS results. .... 146

## List of Abbreviations

<b>PEI</b>	Poly(ethylene imine)
<b>PLG</b>	Poly(ethylene imine)-Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid)
<b>Lys-NCA</b>	Lysine N-carboxyanhydride
<b>Glu-NCA</b>	Glutamic acid N-carboxyanhydride
<b>PEI-rGO</b>	PEI1.8kDa conjugated reduced graphene oxide
<b>MCPEI</b>	PEI1.8kDa conjugated methylcellulose
<b>DOX</b>	Doxorubicin
<b>PIC</b>	Polyion complex

# 제 1 장 서 론

의료용 목적의 고분자 소재는 지난 수십 년간 많은 발전을 이루어져왔다. 고분자가 의료용 소재로 사용된 최초의 사례는 1940년대에 뼈의 손상 부분에 복원 수술을 하면서 처음 이용된 폴리메틸 메타아크릴레이트 (poly(methyl methacrylate), PMMA)였다 [1]. 이후 수십 년간 의료용 소재로써 고분자는 창상 피복제 [2, 3], 체내 임플란트 [4, 5], 질병 치료 목적의 약물과 유전자 전달체 [6, 7] 등 많은 분야에서 응용되고 있다. 특히 고분자는 다양한 개질을 통한 특성 부여, 뛰어난 생체 적합성과 생분해성, 적절한 강도 등의 특성을 가지고 있으며, 이러한 특성 덕분에 약물과 유전자 전달 분야에서 많은 연구와 응용이 진행되어 왔다.

1975년 Ringsdorf는 수용성의 주쇄 고분자 (Backbone polymer), 약물을 담지 혹은 부착할 수 있는 구조, 표적 지향성 분자, 치료 부위에 많은 약물의 축적을 보일 수 있는 높은 분자량 등 총 4가지 특징을 갖는 약물 전달용 고분자의 일반적 구조를 처음으로 제안하였다 (Figure 1) [8]. 많은 시간이 지난 지금도 약물과 유전자 전달체로써 갖추어야 할 기본적 구조는 위의 Ringsdorf가 제안한 4가지 구조의 틀에서 크게 벗어나지 않는다. 더불어 현재의 고분자 전달체 연구는 위의 구조의 개질 및 향상을 통한 약물과 유전자의 전달 효율 증가와 함께 생명공학 기술의 발전으로 인한 다양한 치료 기전 연구, 그리고 실제 연구 과정에서 나타난 한계점들을 극복하며 발전하여왔다. 그 한계점들은 대표적으로 고분자 전달체의 세포 독성, 약물/고분자 혹은 유전자/고분자 복합체 입자의 혈청에서의 안정성,

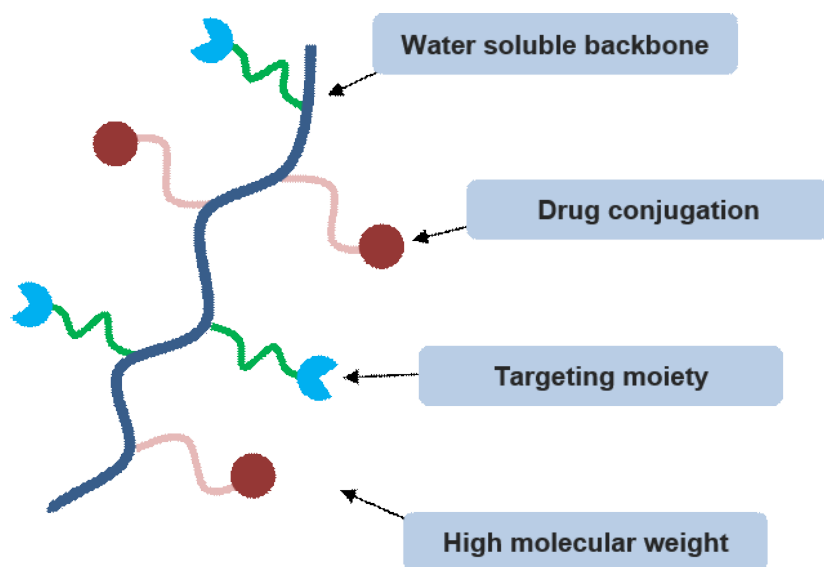


Figure 1. General structures of polymer–drug conjugates drug delivery carriers [8].

낮은 치료 효과 등이 있다. 이러한 한계점은 결국 치료 물질을 세포 내로 전달하는 과정에서의 세포 내, 외 장애물들과 연관되어 있다. 구체적으로 세포 내로 들어가는 과정에서 핵산 분해 효소에 의한 분해, 혈액에서 혈장 단백질과의 상호작용, 세망내피계(Reticuloendothelial system, RES)에 의한 제거, 세포 내 침투과정(Endocytosis), 엔도솜으로부터 탈출 등 다양한 세포 내, 외부 장애물들을 극복하며 궁극적인 치료 효과를 증진하는 방향으로 연구가 이루어져 왔다 [9].

암 치료 목적의 약물과 유전자 전달체 연구는 약물과 유전자의 고유한 특성에서 기인한다. 암 치료 목적의 약물은 많은 수가 소수성의 특징을 가지기 때문에 체내에서 안정적인 전달이 어렵고, 유전자의 경우 많은 핵산 분해 효소에 의해 쉽게 분해되곤 한다. 따라서 이러한 약물과 유전자 자체의 단점을 보완하고 약물과 유전자 치료의 효과를 높이기 위해 전달 시스템을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [10-17]. 약물과 유전자 전달체 연구에서 제일 중요한 점은 충분한 치료 효과를 보이는 양의 약물과 유전자를 적절한 시간에 적절한 양을 적절한 위치로 전달할 수 있어야 한다는 것이다. 이러한 목적 달성을 위해 다양한 방법과 제형을 이용한 연구가 이루어지고 있으며, 현재의 약물 전달체 연구는 고분자, 리포솜 등을 이용한 방법 [18-20], 탄소나노튜브, 산화 그래핀 등 탄소 유래 나노물질을 이용한 방법 [21, 22], 실리카, 금 나노입자 등 무기물을 이용한 방법 [23-25] 등이 있다.

유전자 전달은 유전자 치료 개념에서 출발한다. 유전자 치료는 환자의 조직에 유전자를 전달함으로써 단백질의 발현 혹은 억제를 통해 질병을 치료하는 방법이다. 유전자는 체내에서 안정성이 떨어지

기 때문에 유전자 자체를 체내 주입했을 시 원하는 치료 효과를 달성하기 어렵다. 따라서 유전자를 보호하고 원하는 곳으로 전달하기 위해서는 전달체가 반드시 필요하다. 이러한 유전자 전달체는 바이러스성과 비바이러스성 전달체로 나뉜다. 바이러스성 전달체의 단점인 면역 반응과 전달할 수 있는 유전 물질의 크기 제한 등을 극복하기 위해 비바이러스성 전달체에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 비바이러스성 전달체는 바이러스성 전달체에 비해 낮은 유전자 전달 효율을 보이기 때문에 이러한 단점을 해결하려는 다양한 연구들이 진행되고 있다 [26-29]. 비바이러스성 유전자 전달체 역시 고분자, 리포솜 기반의 전달체가 주로 사용되고 있으며, 대표적으로 아민기를 많이 갖고 있는 폴리에틸렌이민 (Poly(ethylene imine), PEI)을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다.

암 치료 목적의 약물 및 유전자 전달체 연구에서는 종양이 위치하는 곳으로 정확하게 치료 물질을 전달하는 것이 중요하다. 많은 연구들이 암 조직과 정상 조직 간의 차이를 이용하여 전달체의 개질을 통해 치료 효과를 높이는 전략을 사용한다. 구체적으로 암 조직에서는 정상 조직과 다르게 세포의 크기와 모양, 암 세포에서만 나타나는 특이적인 수용체, 상대적으로 느슨한 세포의 배열, pH 등의 차이가 나타난다. 이러한 차이들은 EPR (Enhanced permeability retention) 효과에 의한 수동형 표적 지향 (passive targeting) [30]과 암 세포 수용체를 인지하는 분자를 전달체에 접합하는 능동형 표적 지향 (active targeting) [31]을 통해 암 치료 목적의 약물 및 유전자 전달체의 치료 효과를 증진시킨다. 이러한 표적 지향의 방법과 함께 암 조직과 정상 조직 간 차이를 이용하여 온도, 전기, 빛, 자성과 초음파 등의 물리적 자극, pH, 이온 농도, 산화-환원 환경 등의 화학

적 자극, 효소, 글루코오스 농도, 면역 반응 등의 생물학적 자극 등을 이용한 효과적 전달 시스템에 대한 연구도 진행되고 있다 [32].

pH의 변화는 암 조직과 정상 조직 간의 큰 차이를 나타내는 지표 중 하나이다. 특히 고분자 전달체의 경우 citraconic, aconitic, dimethylmaleic anhydride 등 아민기에 말레익산 아마이드 유도체 (Maleic acid amide derivatives)를 반응하여 카르복실기를 도입하는 방법 [33-40], hydrazone bond 등 산성 조건에서 분해되는 결합을 이용한 방법 [41], 양전하, 음전하로 하전된 아미노산을 이용하여 폴리펩타이드 구조의 고분자를 합성하는 방법 [42-46] 등 외부 pH 조건에 따라 구조적 변화를 갖는 다양한 개질 방법이 존재하고, 이를 이용하여 효과적인 전달 시스템을 연구하려는 노력이 계속되어 왔다. 이중에서도 폴리펩타이드 구조는 라이신 (Lysine), 아르기닌 (Arginine), 히스티딘 (Histidine)과 같은 양이온성의 아미노산과 글루탐산 (Glutamic acid), 아스파탐산 (Aspartic acid)과 같은 음이온성의 아미노산 (Figure 2) 을 이용하여 양전하 음전하 사이의 전하 전환성을 부여할 수 있다.

혈청 단백질을 구성하는 주요 단백질은 알부민으로 음전하를 갖는다 [47]. 따라서 기존의 양이온성 고분자 기반의 약물 및 유전자 전달체는 혈청 단백질과의 정전기적 상호작용 때문에 전달 효율이 크게 감소한다 [48]. 이를 극복하기 위하여 본 연구에서는 음이온성의 글루탐산을 이용하여 체내 일반적 pH 조건에서는 음전하를 가져 혈청 단백질에 대한 저항성을 가지며 안정적으로 존재하다 종양 조직 근처의 약산성 조건에서 양전하로 전환되며 세포 투과율이 증가하는 전하 전환성의 고분자를 제조하였다. 결과적으로 이러한 고분자 전달체는 pH 차이에 따른 음전하-양전하 전환을 통해 약물 및



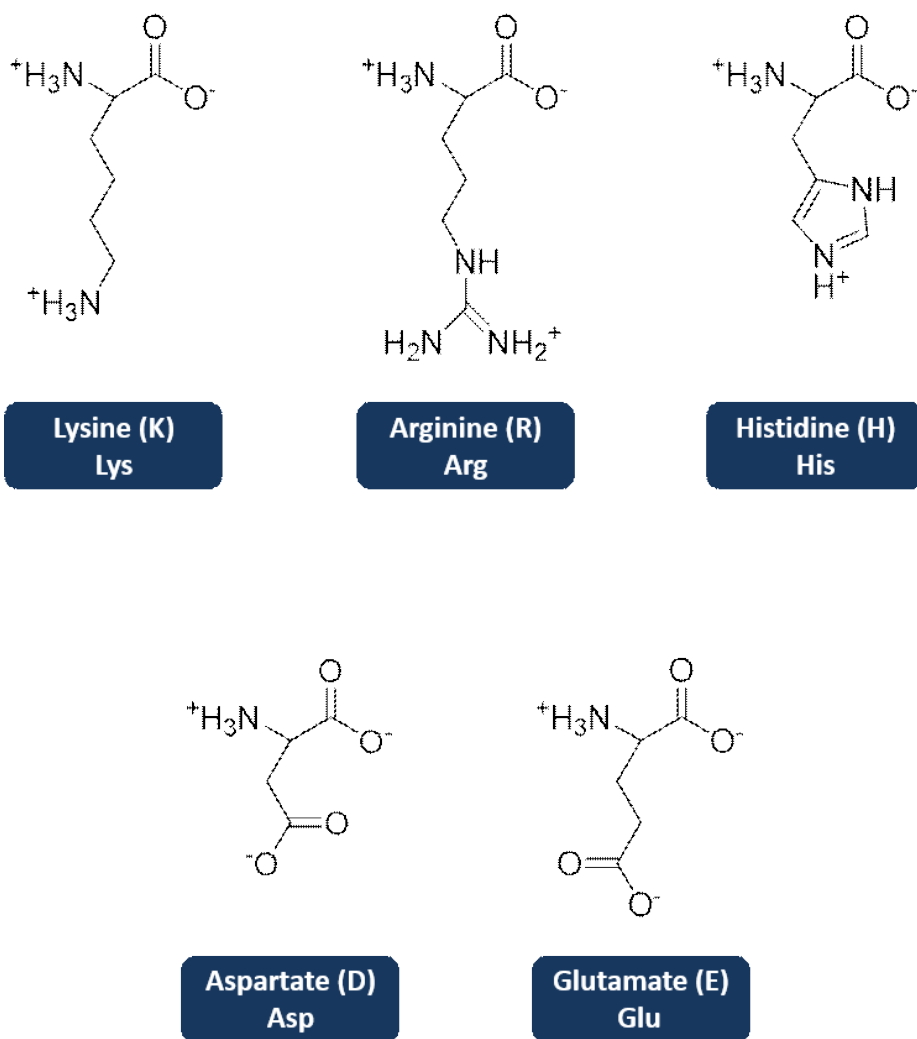


Figure 2. Electrically charged amino acids. Lysine, arginine, histidine, aspartate, glutamate.

유전자 전달 효율을 높이는 효과를 기대할 수 있다.

본 연구에서는 분자량 1,800 Da의 PEI를 개시제로 하여 라이신 N-카르복실무수물 (Lys-NCA)과 글루탐산 N-카르복실무수물 (Glu-NCA)의 연속적인 개환 중합을 통해 얻은 PEI-Lys-Glu (PLG) 고분자를 이용하여 유전자 및 약물 전달체로써 가능성을 확인하였다. 약물 전달체로는 PEI로 개질된 환원성의 산화 그래핀 (PEI-rGO)과 PEI로 개질한 메틸셀룰로오스 (MCPEI)를 PLG 고분자와 함께 이용하였다. 본 연구에서 사용한 PEI-rGO는 다양한 약물의 담지가 가능한 물질로 널리 이용되고 있는 환원성 산화 그래핀에 분자량 1,800 Da의 PEI를 접합하여 개질함으로써 세포막으로의 접근을 용이하게 하고 약물의 전달 효율을 증가시킨 전달체이다 [22]. MCPEI 역시 분자량 1,800 Da의 PEI를 메틸셀룰로오스에 접합함으로써 양이온성 부여를 통해 향상된 약물 및 유전자의 전달 효율을 갖는 물질 [28]로 본 연구에서는 항암제인 독소루비신 (Doxorubicin, DOX) 전달에 이용하였다. 또한 전하 전환성 PLG 고분자의 물리·화학적 성질, 세포 대사 활성 등의 특성 분석을 진행하였고, 암 치료 목적의 유전자 전달체로써 PLG 고분자의 가능성을 확인하였다. 그리고 PEI-rGO와 MCPEI를 전하 전환성 PLG 고분자와 함께 이용하여 암 치료용 약물 전달체로써 가능성을 확인하였다.

## 제 2 장 문헌 연구

### 2.1 암 치료 목적의 유전자 및 약물 전달 시스템으로써의 고분자

생체재료로써 고분자는 의료용 임플란트, 조직공학용 소재에서 약물 및 유전자 전달체까지 다양한 분야에서 발전이 이루어져 왔다. 고분자의 다양한 개질을 이용한 특성 부여, 체내에서의 낮은 면역반응성, 기계적 강도와 물성, 생체 적합성과 생분해성 등 고분자의 다양한 특징들은 의료용 소재로써 고분자를 발전시키는 중요한 요인이었다. 유전자 및 약물 전달 시스템에서는 고분자의 용해성, 약물 및 유전자 담지 능력의 향상, 표적 지향성 분자의 도입 등 유전자와 약물의 치료 효과를 극적으로 증진시킬 수 있는 다양한 전략의 연구가 이루어져 왔으며, 이는 고분자를 이용한 암 치료 목적의 유전자 및 약물 전달 시스템의 발전과 가능성을 동시에 보여주었다.

유전자 치료를 위한 고분자 유전자 전달 시스템으로 가장 많이 사용되는 고분자는 폴리에틸렌이민이다 [49-51]. 가지형의 폴리에틸렌이민은 대표적인 polycation으로 3개의 원자 당 양성자화 가능한 아민의 질소 원소가 하나씩 포함되어 있는 구조로 되어 있어, 음전하를 갖고 있는 유전 물질을 정전기적 인력에 의해 쉽게 보호할 수 있다. 폴리에틸렌이민은 유전 물질과 함께 나노 크기의 복합체를 형성하고 1, 2, 3차 아민을 골고루 갖고 있어 완충 용량이 높아 세포 내에서 효과적으로 유전 물질을 전달할 수 있다. 그러나 분자량에 따른 세포 독성이 높고, 바이러스성 전달체에 비해 낮은 전달 효율은 극복해야 할 단점으로 꼽힌다. 이러한 단점을 극복하기 위해 여

러 연구들이 진행되고 있다. Kim 등은 세포 내 환원성 환경에 반응하여 결합이 끊어지는 이황화결합(-S-S-)을 이용한 유전자 전달 시스템을 개발하였다 [26, 27]. 일반적으로 동물 세포에는 glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine: GSH)이 세포 바깥보다 높은 농도로 존재한다 [53]. 혈장 내 GSH는 2-20  $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 존재하고, 세포 내에는 10 mmol/L의 농도로 존재한다. 이러한 이유로 이황화결합 구조를 갖는 유전자 전달 시스템은 세포 내에서 분해되며 효과적으로 유전자 전달을 기대할 수 있다. 위의 연구에서는 N, N'-cystaminebisacrylamide (CBA), N-Boc-1,6-diaminohexane (DAH)의 Michael addition 반응을 이용하여 고분자의 주쇄에 이황화결합을 갖는 poly(CBA-DAH)를 먼저 합성하고 아민기 말단에 arginine을 도입하여 arginine-grafted bioreducible poly(disulfide amine) (ABP)를 합성하였다. ABP는 PEI25k에 비해 낮은 세포 독성을 갖고 있으며, 최대 30배 가량의 향상된 transfection 효율을 나타내었다. 위와 유사한 방법으로 poly(CBA-DAH)의 말단 아민기에 guanidine기를 도입한 guanidinylated bioreducible polymer (GBP)는 poly(CBA-DAH)에 비해 향상된 핵 국재화 능력 (Nuclear localization ability)를 나타내 높은 transfection 효율을 나타내었다.

또한 유전자 전달 시스템을 이용하여 종양 재발을 억제하는 연구가 진행되었다. Kim 등은 고분자 유전자 전달체로 poly(L-lysine)을 이용하여 cytosine-phosphate-guanine을 갖고 있는 DNA (CpG)를 히알루론산 (Hyaluronic acid, HA)으로 개질한 HA-CpG와 복합체를 형성하고 이를 전달하여 종양 재발 억제를 연구하였다 [54]. CpG는 포유류의 면역 세포로부터 Toll-like receptor 9 (TLR9)을 인식하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 등 cytokine을 생산하고 면역 반응을 활

성화함으로써 감염성 질환, 알러지, 암 등의 치료를 가능케 한다 [55]. 특히 본 논문에서는 tumor rechallenger experiment를 진행하였는데, 1차 항암 치료를 마친 실험동물 쥐의 반대편 옆구리에 1차 항암 치료 실험 때 사용한 동일한 쥐의 림프종 세포 (Mouse T lymphocyte, E.G7-OVA)를 주입하고 21일간 종양의 크기를 측정한 결과, 위의 CpG를 이용한 1차 치료를 한 쥐의 종양 세포의 성장이 억제됨을 확인하였다. 이처럼 유전자를 이용한 면역 치료 방법은 암의 전이 및 재발을 억제하는 유전자 치료의 새로운 방향을 제시하였다고 볼 수 있다.

암 치료를 위한 약물 역시 유전자와 마찬가지로 전달체를 이용하여 치료 효과를 높이곤 한다. 특히 암치료 목적의 약물의 경우 주로 소수성의 특징을 갖고 있기 때문에 소수성 고분자 혹은 소수성을 갖는 분자의 도입을 통해 약물과 담지체 사이의 소수성 상호작용을 통한 마이셀 구조 형성 등의 방법으로 약물의 담지 효율을 높이거나 약물을 고분자 사슬에 직접 접합하는 방법으로 약물을 전달체에 담지하여 치료 효과를 높인다. 고분자를 이용한 약물 전달체 연구는 결과적으로 적절한 위치에 적절한 양의 약물을 전달함으로써 체내 안정성과 치료 효과를 높이고 부작용을 줄이는 전달체 연구로 귀결된다.

Ohya 등은 poly(L-lysine)-block-poly(L-lactide) (PLys-b-PLLA) 공중합체에 음전하를 갖는 히알루론산 (Hyaluronic acid, HA) 코팅을 하여 polyion complex (PIC) 형태로 제조한 나노입자를 약물 전달체로 이용하였다 [56]. HA로 코팅한 나노 약물 전달체는 수용액에서 높은 안정성을 나타내었으며, 코팅하지 않은 약물 전달체와 비교하여 서방성의 약물 방출 특성을 나타내었다. 또한 HA로 코팅한

나노 약물 전달체는 쿠퍼세포 (Kupffer cells)에는 들어가지 않고 간 동양 혈관 상피세포 (Liver sinusoid endothelial cells, LSECs)에 특이적으로 잘 들어가는 것을 확인하여 세포주에 대한 표적 지향성을 갖는 약물 전달체의 가능성을 확인하였다.

앞서 유전자 전달체에서 사용한 세포 내·외 glutathione의 농도 차이에 의한 환원성 환경을 이용하여 약물의 방출을 조절함으로써 치료 효과를 증진시킨 연구도 보고되었다 [57]. Wang 등은 N-carboxyanhydride의 개환 중합을 이용하여 poly(ethylene glycol) (PEG)의 말단에 cysteine (Cys)과 phenylalanine (Phe)을 블록공중합체의 형태로 합성하여 PEG-PCys-PPhe를 합성하였다. PEG-PCys-PPhe의 소수성을 이용하여 마이셀 형태로 약물을 담지한 후 과산화수소를 이용하여 cysteine 사이의 이황화결합 (-S-S-)을 형성하여 입자 내 가교결합을 진행하였다. 이 약물 전달체는 환원성 환경에서 성공적으로 약물을 방출함을 확인하였고, 실제 인간 자궁경부암 세포 (HeLa cells)를 이용하여 세포 독성 실험을 진행한 결과 일반적인 환경에 비해 환원성 환경에서 높은 수준의 세포 사멸 능력을 확인하였다.

## 2.2 pH 감응성을 갖는 고분자를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

### 2.2.1 암 세포 및 조직의 특성

암 세포는 정상적으로 기능을 수행하는 일반 정상 세포와 형태, 세포 증식 및 사멸, 세포 간 상호작용, 세포의 흡착과 감염, 분화, 신호 인식 등 여러 측면에서 서로 다른 특징을 갖고 있다 [58, 59]. 먼

저 암 세포는 정상 세포에 비해 크기와 모양이 다양하다. 또한 세포 내 핵은 불규칙적인 구조를 보이고 상대적으로 작은 세포질을 갖기도 한다. 정상 세포의 경우 세포 분열의 결과 세포의 수가 많아지면 자연스럽게 분열 및 성장을 중지하고 세포 사멸이 진행되는 반면 암 세포의 경우 세포 주기가 정상적으로 진행되지 않아 계속해서 분열하고 성장하는 특징이 있다. 이 결과 암 세포는 서로 군집 형태를 이루게 된다. 정상 세포의 경우 인접한 세포와 서로 상호작용을 하며 적절한 기능 수행을 하지만 암 세포의 경우 세포 사이의 상호작용이 일어나지 않는다. 또한 정상 세포는 세포막에 인접한 세포끼리 서로 붙을 수 있는 기능을 갖고 있는 반면 암 세포는 그러한 기능이 없어 세포끼리 붙지 않는다. 따라서 암 세포는 혈류나 림프절을 따라 체내 넓은 곳으로 분포하기도 하고 다른 장기, 기관으로 전이되기도 한다. 정상 세포는 성장하여 특수한 기능을 하는 세포로 분화되는 반면 암 세포는 분화 및 사멸의 과정을 거치지 않고 계속해서 성장하는 특징이 있다.

이러한 암 세포의 특징은 암 세포가 군집해서 이루는 종양의 미세 환경에도 영향을 미친다. 종양의 미세 환경 (Tumor microenvironment)은 단순히 암 세포의 군집을 의미하는 것이 아니라 면역 세포, 암 연관 섬유 세포 (Cancer-associated fibroblasts), 세포외기질 (Extracellular matrix, ECM), 효소 등 특정 단백질의 농도, 종양 내 산소 분압, pH 등 다양한 구성으로 이루어져 있다 [60-63]. 이러한 미세 환경 내 암 세포들은 성장인자를 포함한 ECM 분해 효소 등의 단백질을 분비함으로써 세포의 성장, 이동, 신생혈관 형성, 전이 등에 영향을 미친다. 근래에는 이러한 종양의 미세 환경을 인식하고 유전자 및 약물을 정확하게 전달하는 것이 암 치

로 목적의 유전자 및 약물 전달체가 가져야 하는 매우 중요한 항목 중 하나이다.

앞서 설명한 바와 같이 종양 조직과 정상 조직 사이에는 대사 환경에 따른 미세 환경의 차이가 존재한다. 종양 조직의 혈관계는 종양 세포의 성장에 필요한 영양소 요구치를 충족시키기에 부족하여 산소 및 영양의 결핍을 초래한다. 따라서 혐기성 조건에서 종양 조직의 대사가 진행되고 이는 젖산 생성과 ATP의 가수 분해로 인한 종양 미세 환경의 산성화를 촉진한다 [64-66]. 이러한 종양 미세 환경의 산성 조건을 이용하기 위해 pH 감응성을 갖는 고분자를 이용한 유전자 및 약물 전달체에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다.

### 2.2.2 pH 감응성을 갖는 고분자와 이를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

현재 주로 연구 중인 유전자 및 약물 전달 시스템을 위한 pH 감응성을 갖는 고분자는 산성 pH에서 약물 및 유전자를 효과적으로 방출하는 기작을 통해 치료 효과를 높이는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 대표적으로 orthoester, hydrazone, acetal/ketal 결합 등 산성 조건에서 잘리는 결합을 포함한 고분자를 제조하여 이를 유전자 및 약물 전달체로 사용하고 있다 [32].

Su 등은 poly( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA)와 아르기닌 (Arginine, Arg)을 이용하여 pH 감응성을 갖는  $\gamma$ -PGA-g-Arg 폴리펩타이드를 제조하였다 [67]. 이 고분자는 pH 3.0 이하에서 자가 조립 (self-assembled) 되며 나노 입자를 형성하고 아르기닌을 접합한 키토산을 이용하여 polyelectrolyte 복합체를 만들었다. 이 나노 복합체를 이용하여 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)



치료에 사용되는 항생제인 amoxicillin을 담지하였다. Amoxicillin은 양전하를 갖고 있는 약물이고,  $\gamma$ -PGA-g-Arg의 카르복실기는 음전하를 갖고 있다. 따라서 약물은 정전기적 상호작용에 의해 담지되고, 담지 효율은  $38.2 \pm 2.4\%$ 를 나타내었다. 이 복합체는 pH 2.5에서 카르복실기가 탈이온화 되고  $\gamma$ -PGA-g-Arg 폴리펩타이드가 응축되며 약물의 방출을 억제하였고, pH 4.5에서는  $\gamma$ -PGA-g-Arg의 카르복실기가 이온화 되지만 아르기닌이 접합된 키토산에 의해 약물 방출이 억제되었다. 이 복합체는 pH 7.0 이상의 조건에서 키토산과  $\gamma$ -PGA-g-Arg가 모두 이온화되면서 약물과 전달체 사이의 정전기적 인력이 약화되고, 키토산과  $\gamma$ -PGA-g-Arg 사이는 같은 전하로 하전 되면서 생긴 정전기적 반발력에 의해 구조가 해체되며 약물이 방출됨을 확인하였다. 따라서 본 나노 복합체를 이용한 전달 시스템은 위산의 pH인 pH 2.5, 위벽의 pH인 pH 4.5에서의 amoxicillin의 방출은 줄어들고, 헬리코박터 균에 의해 감염된 점막의 pH인 pH 7.0 이상에서 방출이 크게 증가하여 경구 투여를 통한 항생제의 효과를 증가시켰다.

산성 조건에서 분해되는 아마이드 결합으로 연결된 poly(D,L-lactide) (PDLLA)와 poly(ethylene glycol) (PEG) 공중합체 (PEG-Dlink<sub>m</sub>-PDLLA)를 이용하여 암 치료 목적의 약물 전달체로 이용한 연구가 2016년 Sun 등에 의해 발표되었다 [68]. 이 연구는 산성 조건에 의해 변화하는 정전기적 인력에 의한 약물 방출의 억제와 축진을 이용한 앞선 연구와는 다르게 산성 조건에서 분해되는 결합을 공중합체 내에 갖고 있다. 따라서 산성 조건에서 나노 복합체의 구조가 붕괴되며 약물을 방출하게 된다. 약물은 도세탁셀 (docetaxel, DTX)을 사용하였으며 담지율은 약 8%였다. 크로마토그

래피와 NMR를 이용하여 pH 6.5 조건에서 아마이드 결합의 분해를 확인한 결과 24시간 후 60%의 결합이 분해되는 것을 확인하였다. 이 나노 복합체는 PEG 코로나가 나노 복합체의 외부에 존재하여 일반적 체내 산성도에서는 PEG에 의해 나노 복합체 내부에 아민기가 숨어있어 표면 전하가  $-12$  mV를 나타내었다. pH 6.5에서는 PEG 부분이 잘리면서 나노 복합체 외부로 아민기가 노출되고 표면 전하가 0에 가깝게 증가하였다. 또 높아진 표면 전하에 의해 세포 투과가 증가하는 결과도 나타났다. 산성 조건에서 분해되는 결합이 없는 고분자를 대조군으로, 산성 조건에서 분해되는 결합이 있는 고분자를 실험군으로 하고 인간 유래 유방암 세포인 MDA-MB-231를 이용하여 세포 실험을 진행한 결과 pH 7.4에서는 결합 유무에 따른 차이가 확인되지 않은 반면, pH 6.5에서는 결합의 유무에 따른 세포 독성의 차이가 확연하게 나타났다. 같은 세포주를 이용한 동물 실험에서는 종양 억제율 (Tumor inhibition rate, TIR)이 아무 처리하지 않은 도세탁셀 16.8%, 산성 조건에서 분해되는 결합이 없는 고분자 47.8%, 산성 조건에서 분해되는 결합이 있는 고분자 78.1%를 나타내며 본 연구에서 합성하고 사용된 고분자 나노 복합체가 동물 실험에서의 종양 억제율이 월등히 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 본 연구를 통해 PEG와 PDLLA 사이의 분해되는 결합을 이용하여 종양의 산성 조건에서 PEG 부분이 떨어지고 표면 전하를 높혀 세포 투과율을 증가시키고 이어 치료 효과를 높이는 전략이 성공적으로 확인되었음을 볼 수 있었다.

## 2.3 전하 전환성 고분자를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

### 2.3.1 말레익산 아마이드 유도체를 이용한 전하 전환성 고분자와 전달 시스템으로의 응용

말레익산 아마이드 유도체 (Maleic acid amide derivatives)는 citraconic anhydride, cis-aconitic anhydride, dimethylmaleic anhydride 등이 존재하며, 대부분의 아마이드 결합이 pH 1 이하 혹은 13 이상 등의 극한 조건에서 분해되는 것과 대비하여 말레익산 아마이드 유도체의 아마이드 결합은 약산성 조건에서 분해되는 특징을 갖는다. 말레익산 아마이드 유도체의  $\beta$ -카르복실기는 카르복실산 및 아마이드기의 cis 형태의 기하학적 배열로 인해 아마이드의 카르보닐기를 쉽게 공격하여 5각 고리구조를 갖는 사면체의 중간체를 형성할 수 있다 [69, 70]. 이러한 반응은 외부 조건의 산성도에 따라 가역적으로 나타난다. Kang의 연구에서는 말레익산 아마이드 유도체의 종류에 따른 분해 거동을 살펴보았다 [36]. 생체 pH 조건인 pH 7.4와 약산성인 pH 5.5에서 시간과 pH에 따른 분해 거동을  $^1\text{H}$  NMR을 이용하여 확인하였고 온도는  $37^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. pH 7.4에서는 사용한 말레익산 아마이드 유도체가 모두 안정하였으나 pH 5.5에서 maleic anhydride를 제외한 citraconic anhydride, cis-aconitic anhydride 그리고 2-(2'-carboxyethyl)maleic anhydride는 8시간 이후 50% 이상의 결합이 분해되었다. 그리고 24시간 이후에는 100%에 가까운 거의 모든 결합이 분해되었다. 말레익산 아마이드 유도체는 염기성이나 생체 pH에서 적절한 안정성을 나타내고, 산성 조건에서 분해되는 특성을 보인다. 즉, 생체 pH에서는 카르복

실산에 의해 음전하를 나타내나 산성 조건에서는 분해되면서 아민기가 노출되어 양전하를 띄는 전하 전환성 특징을 갖는다.

Lee 등은 말레익산 아마이드 유도체 중 *cis*-aconitic anhydride를 이용하여 전하 전환성 고분자를 개질하고 이를 이용한 유전자 전달체 개발에 관한 연구를 진행하였다 [33]. 본 연구에서는 플라스미드 DNA, 양이온성의 고분자, 분해되는 side chain을 갖는 음이온성의 고분자의 3중 구조 형태의 폴리플렉스 복합체를 제안하였다. 유전자와 직접적인 복합체를 이루며 전달체로 사용되는 양이온성의 고분자는 poly(aspartic acid) (pAsp)의 말단에 diethylenetriamine (DET)를 접합한 pAsp(DET)를 이용하였다. 그리고 분해되는 side chain을 갖는 음이온성의 전하 전환성 고분자로는 pAsp(DET)의 아민기를 *cis*-aconitic anhydride로 치환하여 개질한 pAsp(DET-Aco)를 이용하였다. 먼저 플라스미드 DNA와 고분자 사이의 폴리플렉스 형성 후 표면 전하를 측정하였고 N (pAsp(DET)의 아민기에 있는 질소)/P (pDNA의 인산기에 있는 인) 비율 4-8에서 +40 mV 이상 양전하를 갖는 것을 확인하였다. 폴리플렉스 복합체의 pAsp(DET) 무게비 1-4 배를 갖는 전하 전환성 pAsp(DET-Aco)에 앞서 제조한 폴리플렉스를 넣어 3중 구조를 갖는 폴리플렉스 복합체를 제조하였다. 위 폴리플렉스의 전하 전환성은 DLS를 이용한 표면 전하의 측정을 이용하여 확인하였다. 전하 전환성 고분자를 이용한 3중 구조의 폴리플렉스는 pH 7.4에서 -40 mV의 표면 전하를 나타내었지만 pH 5.5에서는 시간에 따라 상승하며 2시간 이후에는 0 mV, 7시간 이후에는 +20 mV에 가까운 표면 전하를 나타내었다. 이러한 폴리플렉스의 전하 전환성은 입자의 크기에 영향을 미쳤다. 전하 전환성 고분자를 이용한 폴리플렉스 복합체는 pH 7.4에서 130 nm의 크기

를 갖고 있다가 pH 5.5가 되면서 크기가 증가하기 시작했다. pH를 조절하고 2시간 후 1  $\mu\text{m}$  이상의 크기를 갖는 입자가 형성되었고, 이는 pH 5.5에서 2시간에 표면 전하가 0 mV에 다다르면서 입자끼리 서로 응집되기 때문이라고 볼 수 있다. 일반적인 양전하를 가진 고분자 유전자 전달체는 혈청 단백질과의 상호작용 때문에 낮은 유전자 전달 효율을 보인다. 그러나 음전하를 갖는 전하 전환성 고분자를 폴리플렉스 표면에 코팅하면 혈청 단백질로부터 안정성을 갖는 입자를 만들 수 있고 이는 본 연구에서도 확인되었다. Bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 전하 전환성 고분자를 이용한 폴리플렉스의 혈청 단백질에 대한 안정성을 확인하였다. 전하 전환성 고분자를 이용한 폴리플렉스는 혈청 단백질 용액 내에서 원래의 입자크기를 유지하며 안정성을 나타내었으나 pAsp(DET)를 이용하여 만든 폴리플렉스의 경우 1시간 이후부터 입자 크기가 바로 증가하기 시작하였다. 그러나 본 연구의 경우 말레익산 아마이드 유도체를 이용하여 아민기를 차폐한 다른 연구들과 마찬가지로 citraconic acid가 제거되는데에 충분한 시간이 필요하다는 단점이 있었다.

양이온을 갖는 대표적 천연 고분자인 키토산에 말레익산 아마이드 유도체를 도입하여 전하 전환성을 부여한 후 감광제 (Photosensitizer) 전달을 통한 광역학 치료 (Photodynamic therapy)에 응용한 연구도 Kim 등에 의해 보고되었다 [34]. 본 연구에서는 글라이콜 키토산 (Glycol chitosan, GC)에 dimethylmaleic anhydride (DMA)를 이용하여 전하 전환성을 부여하고 탄소 동소체 중 하나인 풀러렌 (Fullerene,  $\text{C}_{60}$ )을 감광제로 이용하여 전하 전환성을 갖는 천연고분자 기반의 GC-g-DMA-g- $\text{C}_{60}$ 를 합성하였다. 풀러렌은 670 nm 파장의 빛을 쬔 때 높은 비율로 일중항 산소 (Singlet

oxygen,  $^1\text{O}_2$ )를 발생시킨다 [71-73]. 일중항 산소는 활성산소종 (Reactive oxygen species)의 일종으로 빛이 쬔어졌을 때 에너지 전환에 의해 생성된다. GC의 아민기에는 DMA가 개질되었고, 하이드록실기에는 폴러렌이 개질되었다. GC 1개당 0.57개의 DMA와 0.11개의 폴러렌이 각각 접합되었다. 글라이콜 키토산에 접합된 폴러렌은 일반 폴러렌 입자에 비해 수용액 상에서의 안정성이 크게 증가하였다. 본 고분자는 키토산의 아민기와 DMA의 하이드록실기의 정전기적 인력에 의한 영향으로 세포 외부 조건에서는 약 283 nm의 크기를 갖는 복합체를 형성하다 엔도솜 내부의 pH인 5.0에서는 아민기에 붙어있던 DMA가 제거되면서 정전기적 반발력에 의해 입자간 복합체가 해체되며 약 46 nm 크기의 단일 입자로 분해된다. 표면 전하 역시 pH 7.4에서는 음전하 값을 가지면서 pH 5.0으로 감소할수록 표면 전하가 증가하는 모습을 확인하였다. 이러한 구조적 특징은 실제 치료 효과 증진에 영향을 미쳤다. 인간 유래 비인두 상피암종 세포 (KB cells)에서 치료효과를 확인하였으며 DMA를 통해 개질된 고분자는 pH 7.4에서 약 90%의 세포 생존율을 pH 5.0에서는 약 60%의 세포 생존율을 나타내었으며, 개질되지 않은 고분자의 세포 생존율의 경우 pH 7.4에서 약 58%, pH 5.0에서 57%로 큰 차이를 확인할 수 없었다.

### 2.3.2 폴리펩타이드를 이용한 전하 전환성 고분자와 전달 시스템으로의 응용

폴리펩타이드 기반의 유전자 및 약물 전달 시스템은 다양한 성질을 갖는 아미노산의 조합을 통하여 고유의 성질을 예측하고 제어할 수 있다는 장점을 가진다. 폴리펩타이드 기반의 전달체를 이용하면

친수성, 소수성, 양전하, 음전하, 환원성 환경에 대한 반응 그리고 특정 생체 활성 등 다양한 기능 부여가 가능하다 [74]. 양이온성을 갖는 라이신, 아르기닌, 음이온성을 갖는 글루탐산, 아스파르트산, 소수성 부여를 위한 류신, 페닐알라닌, 환원성 환경에 대한 반응성을 갖는 이황화결합의 형성을 위한 시스테인 등 다양한 성질을 갖는 아미노산 잔기의 조절을 통해 폴리펩타이드는 유전자 및 약물 전달체를 포함한 다양한 생체재료로써 응용되고 있다.

일반적인 유전자 전달체는 양이온성을 갖고 있다. 양이온성을 가지고 있어야 음이온성을 갖는 유전자들과 복합체 형성이 쉽고, 음전하로 하전된 세포의 표면에 쉽게 다가가 세포 내 투과가 가능하기 때문이다. 그러나 이러한 양이온성은 혈액 내 혈장 단백질들과 상호작용하여 혈장 조건에서 전달 효율이 크게 감소하는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 단점을 해결하고자 2010년 Xia 등은 폴리펩타이드를 이용하여 pH 감응성을 갖는 유전자 전달체의 차폐 시스템을 제조하였다 [42]. 본 연구에서는 PEI25k를 기본 유전자 전달체로 하고 이를 pH 감응성을 갖는 고분자인  $\gamma$ -benzyl L-glutamate-co-glutamate acid polymer (PGA(60))로 차폐하여 외부 pH에 감응성을 갖는 유전자 전달 시스템을 고안하였다. 저자는 헥실아민 (Hexylamine)을 개시제로 하여  $\gamma$ -benzyl L-glutamate의 N-카르복시무수물을 이용하여 개환 중합을 통해 차폐 시스템에 이용할 고분자를 합성하였다. 그리고 DNA와 PEI25k의 폴리플렉스를 먼저 만들고 이후에 다양한 무게비에 따라 PGA(60)을 이용하여 3중 나노 복합체를 제조하였다. 이 입자는 PGA(60)의 무게비에 따라 표면 전하와 입자의 크기가 변화하였다. 무게비는 0.625부터 20까지 임의의 간격을 두어 설정하였다. 무게비 0.625에서는 양의 표면 전

하 값이 나타났고, 무게비가 증가할수록 음전하에 가까워지다가 무게비 2.5에서 처음으로 음전하를 나타내었고, 이후 무게비가 증가함에 따라 표면 전하가 점차 감소하며 무게비 20에서는 약 -25 mV의 표면 전하 값을 나타내었다. 그리고 입자의 크기는 아무것도 처리하지 않은 입자가 250 nm의 크기를 가졌던 데에 반해 PGA(60)으로 폴리플렉스를 코팅한 후 무게비 0.625에서는 아주 약간 감소하였다가 그 이후 무게비부터 점차 크기가 커지면서 무게비 7.5에서 800 nm 이상으로 커진 후 무게비 20까지 그 크기가 유지되었다. 이 3중 나노 복합체는 세포 독성을 나타내지 않았고, transfection 실험을 진행한 결과 무게비 0.625, 1.25로 코팅한 나노 복합체는 PEI25k에 준하거나 더 높은 효율의 단백질 발현 효율을 나타내었으나 무게비 2.5부터는 급격하게 감소하여 무게비 5부터는 거의 발현이 되지 않았다.

위와 비슷한 방법으로 차폐 시스템을 이용하여 종양 조직의 환경에 따라 약산성 조건에서의 유전자 전달 효율을 높이려는 연구가 있었다. Tian 등은 라이신과 글루탐산의 공중합체를 이용하여 pH 감응성을 갖는 고분자를 합성하고 이를 이용하여 PEI25k의 차폐 시스템으로 사용하였다 [43]. PEI1.8k를 개시제로 이용하여 라이신과 글루탐산을 차례로 합성하여 pH 감응성을 갖는 고분자 (PELG)를 합성하였다. PELG를 이용하여 PEI/DNA 폴리플렉스를 코팅하여 3중 구조를 갖는 나노 복합체를 형성하였고, 대조군으로는 poly(L-glutamic acid) 고분자를 코팅한 나노 복합체를 사용하였다. PELG를 코팅한 입자는 외부 pH의 변화에 따라 표면 전하가 음전하 (pH 7.4)에서 pH 6.9를 지나는 순간 양전하로 전환되었고, poly(L-glutamic acid)를 코팅한 나노 복합체는 음전하를 계속해서



유지하였다. 이러한 나노 복합체의 특징은 약산성 조건에서의 유전자 전달 효율을 증가시켰다. pH 7.4와 pH 6.8에서 유전자 전달 효율을 확인한 결과, poly(L-glutamic acid)를 코팅한 입자는 유전자 전달 효율이 pH에 따라 큰 차이를 보이지 않은 반면, PELG를 코팅한 PEI25k 기반 유전자 전달 시스템은 pH에 따른 전하 전환성으로 인하여 pH 6.8에서 pH 7.4의 유전자 전달 값보다 약 10배 정도 높은 수준의 유전자 전달 효율을 나타내었다. PELG를 코팅한 PEI25k 유전자 전달 시스템은 pH 6.8에서 pH 7.4에서의 세포 투과율보다 높았다.

앞서 2.3.1에서 설명했던 말레익산 아마이드 유도체와 폴리펩타이드를 동시에 사용하여 약물 전달에 이용한 연구도 보고되었다 [75]. Guan 등은 말레익산 아마이드 유도체인 cis-aconitic anhydride를 이용하여 항암제인 독소루비신의 아민기를 치환하여 cis-aconityl-DOX (CAD)를 제조하였다. 음이온성을 갖고 있는 CAD는 양이온성의 PEI와 정전기적 인력을 통해 서로 상호작용하여 PEI에 담지하였다. 이어서 PEI/CAD 복합체는 위의 논문에서 설명한 PELG를 이용하여 코팅하여 3중 구조를 갖는 나노 복합체를 제조하였다. PELG/PEI/CAD 복합체 역시 외부 pH에 따른 표면 전하의 변화가 관찰되었다. pH 7.4에는 약 -30.64 mV의 전하를 갖고 pH 6.4에서는 +22.1 mV, pH 5.8에서는 +25.7 mV의 전하값을 나타내었다. 이러한 표면 전하값의 변화는 약산성 조건에서 세포의 투과 효율을 높여주어 치료 효과를 증진시켰다. 또한 PELG/PEI/CAD는 pH가 산성으로 변화함에 따라 약물의 방출량도 증가하였다. 약물의 방출 실험을 시작하고 24시간 뒤 최종 약물 방출량은 pH 7.4에서 53.2%, pH 6.8에서는 63.1%, pH 6.4에서는 67.9%, pH 5.8 71.4%를

각각 나타내었다. 이는 약산성에서 CAD의 cis-aconityl기가 제거되며 CAD가 DOX로 환원되고 PEI와의 반발력에 의해 약물이 방출되는 것으로 설명하였다. 이를 통해 PELG/PEI/CAD 약물 전달 시스템은 실제 종양 조직 조건에서 더욱 효율적인 약물 전달과 치료 증진 효과가 나타날 것으로 예상되었고, MTT 실험을 통해 살펴본 세포 독성 평가 결과 pH 6.4에서 poly(L-glutamic acid)를 이용한 PGA/PEI/CAD는 약 50%의 세포 사멸 효과를 나타낸 반면 PELG/PEI/CAD의 경우 90% 이상의 세포 사멸 효과가 나타남을 확인하였다.

## 2.4 산화 그래핀과 메틸셀룰로오스를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

### 2.4.1 의료용 소재로써의 산화 그래핀 및 메틸셀룰로오스의 특성

그래핀 (Graphene)은 탄소 원소가 6각형 벌집모양의 구조를 이루면서 평평한 2차원 단일 층의 구조를 갖는 탄소 구조체로 풀러렌 (Fullerene, C<sub>60</sub>), 탄소 나노 튜브 (Carbon nanotube, CNT), 그래파이트 (Graphite) 등 탄소 동소체의 기본적인 단위 블록이다 [76-78]. 그래핀의 제조는 다층 형태의 그래파이트로부터 접착 테이프를 이용하여 물리적으로 한 층씩 떼어내어 단일 층으로 만들어내는 방법이 가장 쉽고 간단한 방법이다 [79]. 그러나 이러한 제조 방법은 그래핀의 대량 생산이 어려워 산업적 응용이 이뤄지기에는 부족한 점이 많다. 따라서 위의 단점을 보완하기 위해 그래핀의 화학적 제조 방법이 소개되었다 [80-82]. Hummers' 방법으로 산화 그래파이트

(Graphite oxide)를 제조하고 산화 그래파이트를 초음파 처리하여 단일 층으로 박리하여 산화 그래핀 (Graphene oxide)을 얻고 이를 다시 하이드라진 (Hydrazine) 등을 이용하여 환원하여 환원된 산화 그래핀 (Reduced graphene oxide, rGO)을 얻는다. 이 과정에서 얻어지는 산화 그래핀은 하이드록실기 (-OH), 에폭사이드 (-O-), 카르복실기 (-COOH) 등 다양한 친수성의 관능기가 도입되어 수용액 상에서의 분산성이 매우 향상되고 더불어 다른 관능기나 고분자 등의 도입 등 개질이 용이해진다. 또한 위와 같은 구조적 특성으로 인해 그래핀은 고유한 기계적, 열적 그리고 광학적 성질을 갖는다 [83, 84]. 그래핀은 위와 같은 다양한 특성 때문에 약물, 유전자 전달체를 포함한 다양한 분야에서 연구가 진행되어 왔다. 특히 약물 및 유전자 전달체 분야에서 그래핀은 소수성의 약물 전달과 개질을 통한 양이온성 부여를 이용한 유전자 전달 쪽으로 연구가 진행되었다 [22, 85].

다당류는 천연에 존재하는 대표적인 고분자 형태의 물질로써 다양한 단당류의 중합을 통해 형성된다. 다당류는 조류, 식물, 미생물, 동물 등 다양한 원료로부터 셀룰로오스, 알지네이트, 펙틴, 텍스트란, 키토산 등 다양한 형태로 얻어진다 [86]. 다당류는 많은 관능기와 넓은 분자량 분포, 그리고 다양한 화학적 조성 등을 갖고 있어 구조 및 특성의 다양성을 부여한다. 생체재료는 체내에서 안정해야 하고 안전해야 하며 독성이 없고 친수성을 가지면서 분해성을 갖고 있어야 한다. 다당류는 이러한 특성을 대부분 만족하면서 자연에 풍부하게 존재하고 있어 생체재료로 사용되기에 경제적으로도 이점을 갖고 있다. 특히 이중에서도 셀룰로오스는 자연계에 가장 풍부하게 존재하는 천연 고분자로  $\beta$ -D-glucopyranose가 1번 탄소와 4번 탄소

간의  $\beta(1\rightarrow4)$  연결을 통해 반복적으로 연결되어 있다 [87-89].  $\beta(1\rightarrow4)$  연결과 많은 하이드록실기는 셀룰로오스의 분자 간/분자 내 수소 결합을 이루고 이를 통해 셀룰로오스는 높은 배향성을 갖는 결정 구조를 형성한다. 이러한 셀룰로오스의 수소 결합과 결정 구조는 셀룰로오스의 용해성을 크게 떨어뜨렸다. 셀룰로오스의 용해성 증진을 위해 많은 셀룰로오스 유도체에 관한 연구가 진행되었다. 메틸셀룰로오스는 셀룰로오스의 2번, 3번 그리고 6번 탄소의 하이드록실기의 일부를 메틸기 ( $-\text{CH}_3$ )로 치환한 대표적인 셀룰로오스 유도체로써 많은 산업 분야에서 응용되고 있다. 메틸셀룰로오스의 용해성은 치환도에 따라 달라지며 특히 온도에 따른 졸-겔 전이가 관찰되고 이를 이용한 생체재료로써의 응용 연구가 많이 진행되었다.

#### 2.4.2 산화 그래핀을 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

Feng 등은 산화 그래핀을 이용한 유전자 전달 시스템 연구를 발표하였다 [85]. 산화 그래핀의 표면에 layer by layer 방식으로 비공유 결합성 점착을 통해 분자량 10,000의 PEI를 도입하였다 (GO-PEI-10k). GO-PEI-10k는 PEI-10k에 비해 세포 독성이 크게 줄었음을 확인하였다. PEI-10k의  $\text{IC}_{50}$ 이 약 30 mg/L인데 비해서 GO-PEI-10k는 300 mg/L의 농도에서도 80% 이상의 세포가 생존해 있었으며 이는 PEI와 같은 polycation의 독성이 세포막에 부착되면서 생기는 것으로 GO와의 결합을 통해 PEI의 양이온성을 줄여 세포와의 상호작용을 줄임으로써 세포 독성이 감소하였다고 설명하고 있다. GO-PEI-10k는 정전기적 인력을 통해 pDNA와 복합체를 형성하였다. 겔 전기영동으로 확인한 결과 PEI를 이용하지 않은 GO와 pDNA는 무게비 20에서도 복합체를 형성하지 못하고 pDNA를 방출

했지만, GO-PEI-10k의 경우 무게비 5에서 성공적으로 pDNA와 복합체를 이루었음을 확인할 수 있었다. 유전자와 복합체 형성은 PEI의 정전기적 인력에 의한 요인과 함께 그래핀의 표면과 유전자 사이의  $\pi$ - $\pi$  상호작용도 작용하였다 [90, 91]. Enhanced green fluorescence protein (EGFP)를 이용하여 유전자 전달을 통한 단백질 발현 효율을 확인하였다. 대조군인 PEI-10k는 무게비 20, 40, 80에서 모두 높은 효율을 보였으나 무게비 80에서는 세포 독성이 심하여 세포가 많이 죽는데 반해 GO-PEI-10k는 세포 독성이 심하지 않고 동시에 유전자 전달 및 단백질 발현도 잘 나타났다. 결과적으로 산화 그래핀 기반 유전자 전달 시스템의 가능성을 확인하면서 산화 그래핀은 화학적 요법과 광역학적 치료법을 유전자 치료와 동시에 병행하기에 좋은 플랫폼으로 예상하였다. 그러나 본 연구에서는 종양 조직의 다양한 조건에서의 유전자 전달 및 단백질 발현 효율에 대한 연구가 진행되지 못하였다.

앞서 설명한 바와 같이 산화 그래핀은 제조 과정에서 하이드록실기, 카르복실기 등 손쉽게 개질할 수 있는 많은 관능기가 형성된다. 2015년 Siriviriyannun 등이 발표한 연구에서는 산화 그래핀을 플랫폼으로 하여 poly(amido amine) (PAMAM) 덴드리머와 엽산 (Folic acid, FA)을 개질하여 약물 전달 시스템으로 응용하였다 [92]. 산화 그래핀은 탄소 원소로 이루어진 6각 벌집 구조를 기본으로 하고 있기 때문에 유사한 구조의 소수성 약물을 담지하기에 구조적으로 유리하다. 또한 다양한 친수성기를 갖고 있어 수용액에서의 분산성이 뛰어나고 표면적이 넓어 약물 전달 시스템으로써 많은 장점을 갖고 있다. 산화 그래핀은  $\pi$ - $\pi$  상호작용, 공유 결합, 소수성 상호작용, 정전기적 상호작용 등을 통해 치료용 약물을 담지할 수 있다 [93, 94].

본 연구에서는 두 가지 크기를 갖는 산화 그래핀을 사용하였다. 시중에 일반적으로 판매되는 1473 nm 크기의 산화 그래핀 (GO<sub>1500</sub>)과 이를 초음파 처리하여 91 nm의 크기로 만든 산화 그래핀 (GO<sub>100</sub>)이다. 그리고 PAMAM 덴드리머를 이용하여 복합체의 세포막으로 접근성을 향상시켰고 능동형 표적 지향 분자로 엽산을 이용하였다. 먼저 DCC와 DMAP를 이용하여 PAMAM 덴드리머를 산화 그래핀에 부착하였고, EDC/NHS amidation을 통해 FA를 도입하였다. 이 복합체에 독소루비신을 담지하고 시간에 따른 약물 방출을 살펴보았다. 72시간 후 pH 7.4에서는 GO<sub>1500</sub> 복합체와 GO<sub>100</sub> 복합체 각각 26%, 35%의 방출을, pH 5.5에서는 각각 75%, 86%의 약물 방출량을 나타내었다. 이는 DOX의 아민기가 양성자화 되고 수소결합이 깨지면서 산화 그래핀으로부터 방출되었음을 나타낸다. HeLa 세포에서 세포 사멸 효과를 확인해본 결과 GO<sub>1500</sub> 기반 복합체의 경우 GO<sub>1500</sub> 자체의 독성이 있어 PAMAM 덴드리머와 FA를 이용한 개질이 큰 효과를 나타내지 못했다. 그러나 GO<sub>100</sub>의 경우 자체 독성이 크게 감소하였고, PAMAM 덴드리머와 FA 개질 후 DOX의 전달이 효과적으로 이루어졌으며, 특히 HeLa 세포의 경우 FA 수용체를 다량 갖고 있어 더욱 효과가 증진되었을 것이라고 추측하였다. 실제로 FA를 도입한 복합체 (GO<sub>100</sub>/DEN-OH/FA/DOX)의 경우 62.5 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 GO<sub>100</sub>/DEN/DOX에 비해 세포 투과율이 78%에서 97.4%로 크게 증가하였다.

#### 2.4.3 메틸셀룰로오스를 이용한 유전자 및 약물 전달 시스템

다당류 기반의 유전자 전달 시스템에 관한 연구는 많이 이루어졌지만 메틸셀룰로오스를 이용한 유전자 전달 시스템은 2014년 Kim

등에 의해 처음 보고되었다 [28]. 위 연구에서는 메틸셀룰로오스에 michael addition 반응으로 분자량 800 Da의 PEI (PEI0.8k)를 도입하여 양이온성을 갖는 메틸셀룰로오스 (MC-PEI)를 제조하고 이를 유전자 전달 시스템으로 응용해보았다. 메틸셀룰로오스를 sodium periodate를 이용하여 2, 3번 탄소 사이 결합을 깨준 후 imine 형성 반응을 통해 PEI0.8k를 도입하였고, 14.5개 단위 글루코오스 당 1개의 PEI0.8k 분자가 접합되었음을 확인하였다. 합성한 MC-PEI는 무게비 0.75에서 성공적으로 유전자와 폴리플렉스를 형성하였다. DLS를 통해 폴리플렉스의 크기 및 표면 전하를 측정해 본 결과 입자는 200 nm 이하의 크기를 가졌으며 표면 전하는 +20~40 mV를 갖는 것을 확인할 수 있었고, 투과 전자 현미경을 이용하여 본 폴리플렉스 입자의 모양은 구형의 균일한 모양을 갖고 있었다. 쥐의 근아세포 (C2C12 cells)와 HeLa 세포에서 고분자의 세포 독성을 확인하였다. 혈청 단백질 유무와 세포주에 관계없이 MC-PEI는 세포 독성을 나타내지 않았다. 특히 혈청 단백질 조건에서 transfection 실험을 진행하였는데, MC-PEI의 경우 PEI25k와는 다르게 혈청 단백질 조건에서도 단백질 발현율이 크게 감소하지 않았다.

메틸셀룰로오스는 온도에 따라 겔을 형성할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 메틸셀룰로오스 기반의 약물 전달 시스템은 주로 겔 형태를 이용한 연구들이 다수 보고되었다 [95-97]. Kim 등은 저분자량의 메틸셀룰로오스를 Pluronic F127 마이셀과 함께 이용하여 항암제인 도세탁셀 (Docetaxel, DTX)을 전달한 연구를 발표하였다 [93]. 먼저 DTX를 Pluronic F127 마이셀에 담지하고 메틸셀룰로오스, AS와 동일한 무게비로 섞어주었다. 저분자량의 메틸셀룰로오스와 Pluronic F127 그리고 ammonium sulfate (AS)는 15~40℃의 온

도에서 AS의 농도에 따라 겔을 형성하였다. 고성능 액체 크로마토그래피 (High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 DTX의 방출 거동을 시간에 따라 확인하였다. 총 38일간 방출 거동을 확인하였고, 최초 24시간 동안은 20% 미만의 DTX가 방출되었고, 7일째에 50%, 이후부터 매우 천천히 방출량이 증가하며 최종적으로 38일째에 95%의 DTX가 방출되었다. 동물 실험을 통해 치료 효과를 확인해보았다. 쥐의 흑색종 세포 (B16-F10 cells)를 이용하여 동물 실험을 진행하였다. 종양의 크기가 100 mm<sup>3</sup>이 되었을 때 DTX를 담지하고 있는 겔을 5 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg의 농도가 되도록 하여 총 100 µL 부피의 PBS에 분산하여 종양 조직에 직접 주사하였다. 접종 14일 후 종양 조직의 크기를 확인한 결과 아무 처리 하지 않은 종양 조직은 원래 크기의 2배 가까이 성장한 반면, 30 mg/kg 의 농도로 접종한 실험군은 종양 조직이 거의 커지지 않았고, 10 mg/kg은 약 10%, 5 mg/kg은 약 23% 수준의 종양 조직 크기 증가가 나타났다. 이러한 메틸셀룰로오스 기반의 약물 전달체는 메틸셀룰로오스가 갖는 고유의 겔 형성 거동에 국한되어 응용되고 있었으며, 실제로 정맥 주사가 가능한 수용성의 메틸셀룰로오스를 이용한 암치료 목적의 약물 전달 시스템은 그 연구가 거의 이루어 지지 않았다고 볼 수 있다.



## 제 3 장 재 료 및 방 법

### 3.1 재 료

Poly(ethylene imine) (branched, molecular weight 1,800), L-glutathione은 Alfa Aesar (Haverhill, MA)에서 구입하였으며, H-Lys(Z)-OH, L-Glutamic acid  $\gamma$ -benzyl ester, trifluoroacetic acid, methylcellulose, triphosgene, hydrobromic acid solution (33 wt. % in acetic acid), chloroform, citraconic anhydride, agarose, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, sodium chloride, tris base는 Merck (Germany), D<sub>2</sub>O, trifluoroacetic acid-D (D, 99.5%)는 Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA), tetrahydrofuran은 Tokyo Chemical Industry (Japan), doxorubicin은 Tocris Bioscience (Bristol, U.K.), diethyl ether, n-hexane은 Daejung (Korea), thiazolyl blue tetrazolium bromide는 Gold Bio (St.Louis, MO), luciferase assay system과 reporter lysis buffer는 Promega (Madison, WI), BCA<sup>TM</sup> protein assay kit은 Pierce (Rockford, IL), HPLC grade water는 Duksan (Korea)에서 각각 구입하였다. Hoechst 33342, YOYO-1 iodide, Dulbecco's Modified Eagles' Medium (1X)+GlutaMAX<sup>TM</sup>-1 (DMEM), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), 0.25% Trypsin-EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin (Pen Strep, P/S) 모두 Invitrogen-Gibco (Carlsbad, CA)에서 구매하였다.

## 3.2 실험방법

### 3.2.1 전하 전환성 고분자의 합성

#### 3.2.1.1 개환 중합을 위한 단량체의 합성

개환 중합을 이용한 고분자의 합성을 위해 단량체로 N-카르복실 무수물 (N-carboxyanhydride, NCA)을 합성하였다. NCA의 합성은 Daly의 연구를 바탕으로 진행하였다 [98]. Carbobenzyloxy기로 아민기의 활성이 차단된 라이신 (H-Lysine(Z)-OH, Lys(Z))과 benzyl 기로 카르복시기의 활성이 차단된 글루탐산 (L-Glutamic acid  $\gamma$ -benzyl ester, BGlu)을 tetrahydrofuran (THF)에 분산시키고 각 아미노산 몰비의 3배에 해당하는 양의 triphosgene/THF 용액을 천천히 넣어준 후 50°C 온도에서 3시간 동안 완전히 투명해질 때까지 반응시켰다. 반응 후 n-hexane에서 침전을 통해 Lys(Z)-NCA와 BGlu-NCA를 얻었다.

#### 3.2.1.2 PLG의 합성

개환 중합을 이용하여 PEI-Lys(Z)를 합성하였다. 분자량 1,800 Da의 PEI를 클로로포름에 녹인 후 PEI 1몰 대비 50배 당량의 Lys(Z)-NCA를 클로로포름에 분산시켰다. PEI/클로로포름 용액에 Lys(Z)-NCA/클로로포름 분산액을 천천히 넣어준 뒤 30°C에서 3일간 반응하여 PEI-Lys(Z)를 합성하였다. 미반응물은 diethyl ether 침전을 이용하여 제거하였다.

음전하를 갖는 BGlu-NCA를 PEI-Lys(Z)의 말단부터 합성하여 펩타이드 기반의 전하 전환성 PLG 고분자를 준비하였다. BGlu-NCA는 PEI 1몰 대비 50, 70, 90, 130배 당량으로 준비하여 반응을 시작

하였다. 3일간 반응 후 Lys(Z)과 BGlu의 carbobenzyloxy기와 benzyl기를 제거하였다. PEI-Lys(Z)-BGlu를 trifluoroacetic acid (TFA)에 녹인 후 33% bromic acid/acetic acid를 TFA대비 3:1의 부피비로 첨가하고 얼음을 이용하여 0℃에서 3시간 동안 반응하였다. Diethyl ether 침전을 이용하여 미반응물을 제거하고 이틀간 투석을 진행하였다 (MWCO : 6,000~8,000, Spectrum Laboratories, Inc., U.S.A.). 투석은 NaOH를 이용하여 pH를 10으로 맞춘 0.1 M NaCl 수용액에서 3일간 진행하고 (MWCO : 6,000~8,000), 동결건조하여 PLG1.0, 1.5, 1.8, 2.7을 얻었다.

### 3.2.2 전하 전환성 고분자의 특성 분석

#### 3.2.2.1 $^1\text{H}$ NMR을 이용한 구조 분석

단량체인 Lys(Z)-NCA와 BGlu-NCA, 그리고 전하 전환성 고분자의 구조는 양성자 핵자기공명분광기 ( $^1\text{H}$  NMR)를 이용하여 확인하였다. 각 시료는 10 mg/ml의 농도로 750  $\mu\text{l}$ 씩 준비하였고, TFA와  $\text{D}_2\text{O}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)를 용매로 사용하였다. 600 MHz AVANCE 600 (Bruker, Germany)을 이용하여 Lys(Z)-NCA, BGlu-NCA의 구조를, 400 MHz Jeol JNM-LA400 (JEOL, Japan)을 이용하여 PEI-Lys(Z), PLG1.0, 1.5, 1.8, 2.7의 구조를 확인하였다.

#### 3.2.2.2 SEC를 이용한 분자량 측정

사이즈 배제 크로마토 그래피 (Size exclusion chromatography, SEC, YL-9100, Young Lin Instrument, Korea)를 이용하여 전하 전환성 고분자의 분자량을 측정하였다. 시료는 10 mg/mL 농도로 준

비하였고 용매는 1% 포름산을 사용하였다. Poly(ethylene glycol)을 standard로 사용하였고, Ultrahydrogel 250 (Waters, U.S.A.) 컬럼을 이용하여 분석 유속 0.6 mL/min으로 측정하였다.

### 3.2.2.3 PLG의 세포 대사 활성 확인

PLG 고분자의 세포 대사 활성은 MTT 분석법을 이용하여 확인하였다. 먼저 세포 대사 활성을 확인하기 위한 세포주로 인간 자궁경부암 세포 (Human cervical adenocarcinoma cells, HeLa cells)와 인간 폐 선암종 상피세포 (human lung adenocarcinoma epithelial cells, A549 cells)가 사용되었다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Penicillin/Streptomycin, P/S)이 첨가된 DMEM을 배지로 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

각 고분자는 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 µg/mL의 농도로 HCl과 NaOH 용액으로 pH를 7.4, 6.0으로 맞춘 DMEM에 well당 100 µL씩 처리할 수 있도록 준비하였고, 대조군으로 PEI25k를 사용하였다. 세포는 96 well 세포 배양 플레이트에  $1 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양조건에서 24시간 배양하고 이후에 고분자 용액을 4시간 동안 처리하였다. 고분자 처리 시 세포는 대략 70~80%의 밀집도를 보인 상태에서 진행하였다. 이후 고분자 용액을 제거하고 각 well에 10% FBS, 1% P/S를 함유한 배지로 교체해 주었다. 앞서 설명한 배양조건에서 24시간 배양하고 MTT/DPBS 용액 (2 mg/mL)을 각 well당 25 µL 씩 넣어주고 위의 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 형성된 포르마잔 결정을 well 당 150 µL의 DMSO로 용해한 후 microplate reader (Synergy H1,

BioTek, U.S.A.)를 이용하여 흡광도 측정을 통해 고분자를 처리하지 않은 세포의 흡광도에 대한 상대적 세포생존율 (Relative cell viability, %)로 정리하였다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

#### 3.2.2.4 PLG의 산-염기 적정

PLG 고분자의 산-염기 적정 실험을 진행하였다. 각각의 PLG 고분자 20 mg을 20 mL의 0.1 M NaCl 용액에 용해하였다. 1 M NaOH를 이용하여 고분자 용액의 pH를 11로 맞춘 뒤 0.1 M HCl을 25  $\mu$ L 씩 첨가하며 pH가 3이하로 떨어질 때 까지 적정을 진행하였다. 적정 결과를 참고하여 PLG 고분자들의  $pK_a$  값과 완충용량을 확인하였다. PLG 고분자의  $pK_a$  값은 적정 곡선의 기울기가 변하는 지점의 중간값으로 결정하였고, 완충용량은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{완충용량} = \frac{\Delta V_{HCl} \times 0.1M}{m_{PLG \text{ polymers}}}$$

$\Delta V_{HCl}$ 은 용액의 pH가 7.4에서 5.1까지 변화하는 과정에서 사용된 HCl의 부피 (L)를 나타내고,  $m_{PLG \text{ polymers}}$ 는 사용된 고분자 20 mg 내에 존재하는 양성자화 가능한 아민의 몰수와 PLG 고분자의 질량 두 가지 경우에 대하여 계산을 진행하였다.

#### 3.2.2.5 PLG의 입자성 확인

PLG 고분자의 입자 형성은 투과도 측정을 통해 확인하였다. 각각의 PLG 고분자는 1 mg/mL의 농도로 5 mL을 준비하였고, HCl 및

NaOH를 이용하여 pH를 11로 맞추었다. 0.1 M HCl 용액을 이용하여 pH를 0.5씩 낮추어 가며 100  $\mu$ L의 부피의 PLG 고분자 용액을 각각 수거하였고, microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A.)를 이용한 투과도 측정을 통해 입자 형성을 확인하였다.

PLG1.8 고분자의 경우 pH에 따른 입자 형성을 확인하였다. 입자의 특성 확인은 동적 광산란법 (Dynamic Light Scattering, DLS)을 이용하였다. 위와 같은 방법으로 HCl 및 NaOH를 이용하여 pH를 조절하고 1 mg/mL 농도의 PLG1.8 고분자 용액 pH 10부터 3까지의 시료를 준비하였다. 동적광산란 측정기 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)을 이용하여 PLG1.8 고분자 입자의 크기와 표면 전하를 측정하였다.

### 3.2.3 PLG를 이용한 유전자 전달 시스템으로써의 성능 평가

#### 3.2.3.1 PLG의 폴리플렉스 형성 확인 및 특성 분석

PLG 고분자의 pDNA와의 폴리플렉스 복합체 형성은 아가로스 겔 전기영동법을 이용하여 확인하였다. 이때 사용된 pDNA는 pCN-Luci로 luciferase를 발현하는 플라스미드이다. Competent cell로 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였으며, pDNA는 Nucleobond<sup>®</sup> Xtra Midi (Macherey-Nagel, Germany) pDNA purification kit를 이용하여 얻었다.

고분자를 pDNA (pCN-Luci, 0.5 mg/mL) 0.5  $\mu$ g의 무게 대비 5, 10, 20, 30배로 준비하였고, pH 7.4의 hepes buffer에서 잘 섞어준 뒤 30분간 보관하였다. 아가로스 겔은 0.7% 농도로 준비하였고 (350 mg agarose in 50 mL Tris base-Acetate-EDTA buffer, TAE buffer), 겔이 굳기 전에 5  $\mu$ g의 ethidium bromide를 넣어주었다. 전

기영동은 TAE (Tris base-Acetate-EDTA) buffer 상에서 전기영동 장치 (Mupid-2 plus®, Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 12분간 진행하였다. 전기영동이 완료된 후 겔은 GelDoc™ XR+ gel documentation system (BIO-RAD, Hercules, U.S.A.)을 이용하여 확인하였다.

PLG1.8 고분자의 폴리플렉스 형성 거동 확인을 위해 산성 조건에서 아가로스 겔 전기영동을 실시하였다. 실험은 pH를 제외하고 동일한 조건에서 진행하였으며, pH 5.0의 Hepes buffer를 이용하여 산성 조건에서의 PLG1.8 고분자 폴리플렉스 형성 능력을 확인하였다.

폴리플렉스 형성은 PicoGreen assay를 통해 다시 확인하였다. PicoGreen 시약은 dsDNA와 상호작용을 통해 형광을 방출하는 물질로 dsDNA의 검출에 주로 사용된다. PLG1.8 고분자를 이용하여 위와 같은 방법으로 폴리플렉스를 제조하였다. 제조한 폴리플렉스 용액에 같은 부피의 PicoGreen 시약을 넣어주고, 4분간 반응시킨 뒤 Ex/Em = 480/520 nm에서 형광을 측정하였다. 대조군으로 pDNA를 사용하였고, pDNA의 형광 값에 대한 비율로 결과를 정리하였다.

PLG1.5 및 PLG1.8 폴리플렉스 입자의 크기와 표면 전하는 동적 광산란법을 이용하여 측정하였다. pDNA는 앞서 설명한 pCN-Luci를 사용하였다. PLG 폴리플렉스 제조 방법은 위에 설명한 방법으로 이루어 졌으며, 각 시료당 pDNA 2 µg과 pDNA의 무게 대비 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100배에 해당하는 고분자 용액을 이용하였고, 시료의 최종 부피는 1 mL로 만들었다. pH는 10 mM HCl, NaOH 용액을 이용하여 7.4와 6.0으로 맞추었다. 동적광산란 측정기는 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)을 이용하였고 폴리플렉스 입자의 크기와 표면 전하는 3번씩 측정하였다.

### 3.2.3.2 PLG 폴리플렉스의 transfection 효율 평가

PLG 폴리플렉스의 유전자 전달 효율 측정을 위하여 reporter gene으로 pCN-Luci를 이용하여 luciferase 단백질의 발현을 확인하였다. 세포주는 HeLa와 인간 폐 선암종 상피세포 (A549 cells)를 사용하였다. 24 well 세포 배양 플레이트에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양조건에서 24시간 배양하였다. 각 well당 pDNA는 0.5 µg 씩, 부피는 100 µL가 되도록 폴리플렉스 용액을 준비하였고, 고분자 용액은 pDNA 무게 대비 60, 80, 100배를 준비하였다. 폴리플렉스는 앞서 설명한 방법으로 제조하였다. 고분자 용액 처리에 앞서 혈청 단백질을 함유하지 않은 배지와 혈청 단백질을 함유한 배지로 나누어 각각의 pH를 7.4, 6.0이 되도록 1 M HCl, NaOH 용액을 이용하여 맞추어 주었다. 혈청 단백질의 유, 무 및 pH에 따라 총 4가지 조건 (혈청 단백질을 함유하지 않은 pH 7.4, 6.0 배지, 혈청 단백질을 함유한 pH 7.4, 6.0 배지)에서 실험을 진행하였다. 각각의 배지 400 µL을 well에 먼저 넣어주고 폴리플렉스 용액 100 µL를 넣어주었다. 4시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였고 10% FBS, 1% P/S를 함유한 배지로 교체해 주었다. 48시간 배양 후 배지를 제거하고 DPBS로 2회 well 내 세포를 세척하였다. well당 150 µL의 lysis buffer를 분주하고 30분간 shaking incubator에서 배양하였다. 배양 후 세포가 충분히 떨어지도록 하고 원심분리 (10,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액만 취하고 luciferase assay kit을 이용하여 발광도를 측정하였다. 불투명한 96 well 플레이트에 상등액 20 µL를 넣고 luciferase assay buffer 100 µL를 분주하고 10초간 발광도를 측정하였다. 발광도는 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 측정하였고 단위는 상대



적 발광도 값 (Relative Light Unit, RLU)으로 표현하였다. 이어서 Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo, U.S.A.)을 이용하여 세포 상등액의 단백질 정량을 진행하였다. Transfection 실험의 최종 결과는 세포 내 단백질의 단위 mg 당 상대적 발광도 값 (RLU/mg protein)으로 표현하여 나타내었고, 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

PLG의 엔도솜 내 완충 효과 확인을 위해 bafilomycin A1을 처리한 상태에서의 transfection 실험을 진행하였다. 세포주는 HeLa, A549 세포를 사용하였다. 무게비 1의 PEI25k/pCN-Luci 폴리플렉스와 무게비 60, 80, 100의 PLG1.8/pCN-Luci 폴리플렉스를 이용하였으며, 폴리플렉스 처리 전 200 nM의 bafilomycin A1/DPBS 용액을 10분간 처리하였다. 이후 일반적인 실험 방법은 위의 transfection 실험 방법과 동일하게 진행하였다.

### 3.2.3.3 PLG 폴리플렉스의 세포 투과율 평가

PLG 폴리플렉스의 세포 투과율 평가를 위해 유세포분석법 (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)을 이용하였다. 세포는 HeLa와 A549를 사용하였다. 6 well 세포 배양 플레이트에  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 위의 세포 배양조건에서 24시간 동안 배양하였다. pDNA는 pCN-Luci를 사용하였으며, 사용하기에 앞서 YOYO-1 iodide를 이용하여 50개 염기쌍 당 1개의 염료 분자가 들어가도록 처리한 뒤 사용하였다. 최종 부피가 500  $\mu$ L가 되도록 폴리플렉스 용액을 준비하였다. pH와 혈청 단백질 유무에 따라 총 4가지 배지를 준비하였고 (pH 7.4, 6.0, 혈청 단백질 유, 무), 폴리플렉스 용액 처리 전 well 당 1.5 mL의 배지를 미리 분주해 주었다. 폴

리플렉스 용액을 처리한 후에 4시간 동안 위의 세포 배양조건에서 배양 후, 세포를 0℃의 DPBS로 2회 세척하고 트립신을 이용하여 부착 세포를 떼어주었다. 떼어낸 세포를 300  $\mu$ L의 DPBS를 이용하여 잘 분산시키고 측정을 위한 시료로 준비하였다. 유세포 분석은 flow cytometry BD Accuri C6 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA)를 사용하였고 결과는 Flowing software를 이용하여 정리하였다.

#### 3.2.3.4 치료용 유전자를 이용한 PLG 폴리플렉스의 암세포 사멸 효과 평가

치료용 유전자는 세포 사멸 (apoptosis)을 유도하는 유전자인 pJDK-apoptin과 Bcl-2 siRNA를 이용하여 실험하였다. Apoptin 유전자는 닭의 빈혈 바이러스로부터 얻어지는 작은 단백질로 종양 세포를 특이적으로 죽이는 특징을 갖고 있다 [99-101]. 또한 Bcl-2 siRNA 유전자는 인간의 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) 발현을 억제하는 단백질로 Bcl-2 즉 단백질은 세포 사멸과 관련한 핵심 조절 인자로서 다양한 종양 세포에서 과량으로 발현되어 세포 사멸을 억제하고, 치료제에 대한 내성을 유발한다고 알려져 있다 [102].

Apoptin을 이용한 유전자 전달 및 단백질 발현을 통한 세포 사멸 연구는 MTT 시약을 통해 확인하였으며 transfection 과정까지는 위의 실험과 동일한 방법으로 진행하였다. HeLa 세포를 48 well 세포 배양 플레이트에  $1.5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 분주하고 24시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. 0.025 mg/mL 농도의 apoptin 용액을 준비하였고, 무게비 1의 PEI25k를 대조군으로, 무게비 60, 80, 100의 PLG1.8을 실험군으로 이용하였다. DMEM에 각각의 고분자

용액을 무게비에 맞추어 넣어주고 apoptin 용액을 천천히 넣어준 후 30분간 보관하여 폴리플렉스를 형성하였다. 0.1 M HCl을 이용하여 혈청 단백질을 함유한 DMEM과 함유하지 않은 DMEM의 pH를 각각 7.4와 6.0으로 맞춘 후 앞서 제조한 폴리플렉스 용액을 넣어주고 4시간 동안 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였다. 4시간이 지나고 혈청 단백질을 포함한 DMEM으로 배지를 교체해주고 48시간 후 MTT 용액 처리를 하여 2시간 동안 37℃에서 배양하였다. DMSO로 석출된 포르마잔 결정을 용해시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하고 상대적 세포 생존율을 이용하여 세포의 활성 감소 효과를 확인하였다.

Bcl-2 siRNA는 Sense: CAGAAGUCUGGGAAUCGAU(dTdT) (5'-3'), Antisense: AUCGAUUCCCAGACUUCUG(dTdT) (5'-3') 서열을 가진 siRNA를 이용하였다. 위와 마찬가지로 실험 세포주로 HeLa 세포를 이용하였으며, 48 well 세포 배양 플레이트에 세포를  $1.5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 분주하고 24시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. siRNA는 well 당 0.25 µg이 들어가도록 무게비 1의 PEI25k와 무게비 60, 80, 100의 PLG1.8을 준비하였다. 위와 동일한 방법으로 폴리플렉스를 제조하고 pH와 혈청 단백질 유무에 따라 총 4가지 배지 조건에서 실험을 진행하였다 (pH 7.4, 6.0, 혈청 단백질 유, 무). 4시간 동안 세포 배양 조건에서 폴리플렉스 처리를 마치고 일반 배지로 교체해 준 뒤 48시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. 48시간 후 MTT처리를 해주고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 형성된 포르마잔 결정을 DMSO를 이용하여 용해시키고 흡광도 측정을 통해 상대적 세포 생존율을 확인하였다.

### 3.2.4 PLG를 코팅한 PEI 개질 산화 그래핀 (PEI-rGO) 약물 전달체의 성능 평가

#### 3.2.4.1 PEI-rGO의 DOX 담지 및 함량 확인

PEI-rGO는 포항공대 김원중 교수님으로부터 제공받았으며, 제조 방법은 다음의 연구에서 확인할 수 있다 [103, 104]. PEI로 개질된 산화 그래핀은 질량 대비 62%가 PEI로 개질되어 있다. 독소루비신은 5 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여서 활용하였다. PEI-rGO 용액에 PEI-rGO의 무게 대비 50%에 해당하는 양의 DOX/DMSO 용액을 천천히 넣어주고 12시간 동안 빛을 차단한 상태에서 3D shaker로 섞어주었다. 반응이 끝난 후 PEI-rGO에 담지되지 않은 DOX 제거를 위하여 투석을 진행하였다. MWCO 3,000의 투석막을 이용하여 24시간 투석하였고, 이후에 Amicon® Ultra-4 centrifugal filters 3K (Merck Millipore, Ireland)를 이용하여 원심분리 (4000 rpm, 25℃, 20분)를 통해 PEI-rGO/DOX를 얻을 수 있었다. PEI-rGO/DOX는 DOX를 담지하지 않은 PEI-rGO의 흡광도를 이용하여 농도를 맞추는 후 사용하였다.

PEI-rGO/DOX의 DOX 담지 및 함량은 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A.)를 이용한 형광 및 흡광도 측정을 통해 확인하였다. PEI-rGO의 농도를 1 mg/mL로 맞추는 PEI-rGO/DOX 분산액 10  $\mu$ L를 물과 DMSO 90  $\mu$ L에 각각 넣어 excitation 파장을 480nm로 고정하고 520 nm부터 700 nm까지의 emission 파장 측정을 통해 DOX의 담지 여부를 확인하였다. DOX의 함량은 300 nm부터 700 nm까지의 흡광도 측정을 통해 500 nm에서 DOX이 담지되지 않은 PEI-rGO와 PEI-rGO/DOX 사이의 흡광도 차이로 계산하였다.

### 3.2.4.2 PLG를 이용한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 코팅 및 특성 분석

PLG를 이용한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 코팅을 하기에 앞서 코팅을 위한 적절한 고분자 양의 확인을 위해 PEI-rGO 20  $\mu\text{g}$ 의 무게 대비 10, 20, 30, 50배의 전하 전환성 고분자 용액 (PLG1.0, 1.5, 1.8, 2.7)을 준비하였다. 준비한 고분자 용액에 PEI-rGO 용액을 한 방울씩 천천히 떨어뜨리며 넣어주었다. 3D shaker에서 흔들어주며 1시간 동안 보관한 뒤 DLS를 이용하여 입자의 크기와 표면 전하 측정을 진행하였다. 동적 광산란기는 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)를 사용하였고, 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

PLG로 코팅한 PEI-rGO의 pH에 따른 차이를 DLS를 이용하여 확인하였다. PEI-rGO에 대한 PLG의 무게비는 30으로 설정하였고, 앞서 설명한 방법으로 코팅을 진행하였다. PLG로 코팅한 PEI-rGO 용액의 pH를 10 mM HCl과 NaOH를 이용하여 7.4와 6.0으로 맞추고 30분간 보관하였다. 시료를 동적 광산란기 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)를 이용하여 사이즈와 표면 전하의 변화를 측정하였다. 추가로 PEI-rGO에 DOX를 담지한 입자도 동일한 코팅과 pH에 따른 차이를 보이는지 확인하기 위해 PLG1.8과 PLG1.5로 코팅한 두 입자에 대한 실험도 진행하였다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

PEI-rGO와 PEI-rGO/DOX의 코팅 전후 형태 확인을 위해 에너지 여과 투과 전자 현미경 (Energy-Filtering Transmission Electron Microscope, EFTEM, LIBRA 120, Carl Zeiss Germany)을 이용하였다. 시료는 PEI-rGO, PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX,

PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO/DOX 총 4가지를 준비하였다. 각각의 시료는 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX 10 µg 대비 무게비를 30으로 하여 고분자 코팅을 진행한 뒤 구리 격자판에 흡착시키고 12시간 건조 후 가속 전압 80 kV 조건에서 촬영하였다.

PLG 코팅 여부에 따른 혈청 단백질에 대한 안정성 확인 실험을 진행하였다. 코팅은 앞서 설명한 방법으로 진행하였고 100 µg의 PEI-rGO를 이용하여 무게비로 30배의 PLG1.5로 코팅한 샘플과 코팅하지 않은 샘플을 준비하였다. 초원심분리기 (1580MGR, Labogene, Korea)를 이용하여 PEI-rGO, PLG1.5 coated PEI-rGO를 원심분리하고 10% FBS를 포함한 pH 7.4, 6.0 조건의 PBS 5 mL을 이용하여 분산시켰다. 이후 각 시료는 37°C, 3D shaker에서 보관하면서 시간에 따른 샘플을 채취하였다. 각 샘플은 동적 광산란기 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)를 이용하여 입자의 크기를 측정하였다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 약물 방출 실험을 진행하였다. 약물 방출은 PEI-rGO/DOX 100 µg 기준으로 무게비 30의 PLG1.5 코팅을 하여 시료를 준비하였다. 시료의 총 부피를 2 mL로 맞추어 MWCO 3000의 투석막에 넣고 50 mL 부피의 코니컬 튜브에 넣어주었다. pH 7.4, pH 5.0, 5 mM의 GSH를 함유한 pH 5.0의 PBS 등 총 3조건의 PBS 용액을 준비하였고, 각각의 PBS 10 mL을 넣어 0시간부터 24시간까지 특정 시간에서의 시료를 채취하여 형광을 측정하였다 (Ex/Em = 480 nm/560 nm). 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

#### 3.2.4.3 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 실험

PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 실험을 진행하였다. 먼저

HeLa 세포주에서의 MTT 시약을 이용한 세포 대사 활성 실험을 하였다. 96 well 세포 배양 플레이트에 well 당  $1 \times 10^4$  개의 세포를 분주하였고, 24시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. 배지는 혈청 단백질이 있는 배지와 없는 배지에 HCl과 NaOH 용액을 이용하여 pH를 7.4와 6.0으로 맞추어 총 4가지 조건의 배지를 사용하였다. PEI-rGO/DOX 분산액은 DOX의 농도를 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 맞추었고, well당 100  $\mu\text{L}$  부피로 24시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 배양조건에서 처리해 주었다. 24시간 후 PEI-rGO/DOX 분산액을 제거하고 각 well은 10% FBS, 1% P/S를 함유한 배지로 교체해 주었다. 위의 세포 배양 조건에서 배양한 후 MTT/DPBS 용액 (2 mg/mL)을 각 well당 25  $\mu\text{L}$  씩 넣어주고 37°C에서 2시간 보관한 뒤 배지를 제거하고 150  $\mu\text{L}$ 의 DMSO를 이용하여 포르마잔 결정을 용해시키고 570 nm에서의 흡광도를 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 세포 대사 활성은 앞서 설명한 방법으로 정상 세포의 생존율에 대한 상대적 세포 생존율 (Relative Cell Viability, %)로 나타내었다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

PEI-rGO/DOX의 세포 투과율 확인을 위해 유세포분석법 (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)을 이용하였다. 6 well 세포 배양 플레이트에 well당  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 분주한 뒤 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 24시간 배양하였다. 배지는 앞서 설명한 방법대로 총 4가지 배지 (pH 7.4, 6.0, 혈청 단백질 유무)를 준비하였고, PEI-rGO/DOX 분산액은 PLG1.5로 코팅을 한 것과 하지 않은 것을 준비하였다. Well 당 1.5 mL의 배지를 먼저 깔아주고 PEI-rGO/DOX, PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO/DOX를 각각 처리해 준

후 위의 세포 배양 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 0℃의 DPBS로 2회 세척하고 트립신을 처리하여 세포를 떼어내었다. 300 µL의 DPBS를 이용하여 떼어낸 세포를 잘 분산시켜주고 flow cytometry BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분석 결과는 Flowing software를 이용하여 정리하였다.

세포 내 존재하는 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 확인을 위하여 형광 현미경을 이용하였다. 세포주는 HeLa, A549 두 세포주를 사용하였다. 6 well 세포 배양 플레이트에 well 당  $2 \times 10^5$  개의 세포를 분주하였고, 24시간 동안 위의 세포 배양 조건에서 배양하였다. 배지는 앞서 설명한 방법대로 총 4가지 조건의 배지 (pH 7.4, 6.0, 혈청 단백질 유무)를 준비하였다. 각 well 당 1.85 mL의 배지를 우선 처리한 뒤 최종 DOX 농도가 10 µg/mL가 되도록 PEI-rGO/DOX 및 PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO/DOX 분산액 150 µL를 준비하여 처리한 뒤 24시간 동안 위의 세포 배양 조건에서 배양하였다. PEI-rGO/DOX 분산액을 제거하고, DPBS로 2회 세척한 뒤 10 µg/mL 농도의 Hoechst 33342로 세포핵을 15분간 염색해 주었다. 다시 세포를 DPBS로 2회 세척하고 형광 현미경 (iRiS<sup>TM</sup> Digital Cell Imaging System, Logos Biosystems, Korea)을 이용하여 세포를 관찰하였다.



### 3.2.5 PLG를 이용한 PEI 개질 메틸셀룰로오스 (MCPEI) 기반 약물 전달 시스템의 성능 평가

#### 3.2.5.1 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 제조, 약물 담지 및 함량 확인

MCPEI를 이용한 약물 전달 실험은 Kim의 방법을 참고하여 만들어진 MCPEI를 가지고 진행하였으며 [28], 합성은 분자량 1,800 Da의 PEI를 이용하였다. 메틸셀룰로오스를 과요오드산나트륨 ( $\text{NaIO}_4$ )을 이용하여 산화시킨 후 1개의 글루코오스 단위체당 2개의 알데하이드기를 갖는 산화메틸셀룰로오스를 얻었다. 이어 글루코오스 단위체당 5배 당량의 분자량 1,800 Da PEI를 이용하여 반응시켰다. 반응 후 생성된 이민 schiff base 및 미반응 알데하이드기는 수소화붕소나트륨 ( $\text{NaBH}_4$ )을 이용하여 환원시키고 투석 및 동결건조를 통해 최종적으로 MCPEI를 얻을 수 있었다.

DOX 담지는 메틸셀룰로오스 (MC)와 PEI 개질 메틸셀룰로오스, PEI25k, 그리고 두 종류의 전하 전환성 PLG 고분자 (PLG1.0, PLG2.7)를 이용하였고, MC와 MCPEI, 전하 전환성 고분자를 조합하여 총 네 가지 샘플을 준비하였다 (MC/DOX, MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX, MCPEI+PLG2.7/DOX). 각각의 고분자는 2 mg, DOX는 1 mg을 준비하였고, 각 고분자가 2 mg씩 용해되어있는 용액에 5 mg/mL 농도의 DOX/DMSO 용액 200  $\mu\text{L}$  (DOX 1 mg)을 넣어준 뒤 빛을 차단한 상태에서 12시간 동안 3D shaker에서 보관하였다. 담지가 완료된 후 담지되지 않은 약물은 투석을 통하여 제거하였다. 분자량 컷오프 3,000의 투석막을 이용하여 24시간 투석을 진행하였고, 동결건조를 하여 DOX가 담지된 전하 전환성 고분자를 이용한 MCPEI 기반 약물 전달 시스템을 제조하였다.

담지된 약물의 양은 DOX의 형광 측정을 이용하여 확인하였다. 동결건조 후의 고분자/DOX 담지체의 질량을 바탕으로 5 mg/mL의 농도가 되도록 물에 분산시킨다. 위의 고분자/DOX 담지체의 분산액을 90%의 DMSO 조건에서 담지된 DOX가 충분히 탈착되도록 한 후에 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 형광을 측정하였다 (Ex/Em = 480 nm/560 nm). DOX의 담지량 확인은 DOX의 농도에 따른 형광의 적정 그래프를 그려서 계산하였으며 약물 담지 함량 (Drug loading content, DLC, %)과 약물 담지 효율 (Drug loading efficiency, DLE, %)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{약물 담지 함량(DLC, \%)} = \left( \frac{\text{담지된 DOX의 무게 (mg)}}{\text{고분자/DOX담지체의 무게 (mg)}} \right) \times 100\%$$

$$\text{약물 담지 효율(DLE, \%)} = \left( \frac{\text{담지된 DOX의 무게 (mg)}}{\text{담지에 사용한 DOX의 총 무게 (mg)}} \right) \times 100\%$$

### 3.2.5.2 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 특성 분석

DOX가 담지된 MCPEI, 전하 전환성 고분자 입자의 pH에 따른 크기와 표면 전하는 DLS를 이용하여 확인하였다. 입자의 크기와 표면 전하는 총 3가지 샘플 (MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX, MCPEI+PLG2.7/DOX)에 대하여 측정을 진행하였다. DOX 농도 기준으로 0.1 mg/mL의 고분자/DOX 담지체 분산액 1 mL을 10 mM HCl, NaOH 용액을 이용하여 pH를 각각 7.4, 6.0, 5.0으로 맞추어 준 뒤 Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K.)을 이용하여 입자의 크기와 표면 전하를 측정하였다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

DOX 담지 MCPEI, 전하 전환성 고분자 입자의 약물 방출 실험을 진행하였다. 앞서 실험과 동일하게 총 3종류의 샘플 (MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX, MCPEI+PLG2.7/DOX)의 방출 거동을 확인하였다. DOX 농도 기준으로 0.1 mg/mL의 MCPEI+전하 전환성 고분자/DOX 담지체 분산액 2 mL을 MWCO 3000의 투석막에 넣고 50 mL의 코니컬 튜브에 넣어주었다. pH 7.4와 pH 5.0 두 종류의 PBS 용액 10 mL을 준비하여 0시간부터 24시간까지 특정 시간 단위로 시료를 채취하였다. 형광 측정은 각 시간 단위로 채취한 시료를 microplate reader를 이용하여 확인하였다 (Ex/Em = 480 nm/560 nm). 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

### 3.2.5.3 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자를 이용한 세포 실험

DOX가 담지된 MCPEI, 전하 전환성 고분자 기반 약물 전달 시스템을 이용한 MTT 실험을 진행하였다. 세포주는 HeLa, A549 세포를 이용하였고 96 well 세포 배양 플레이트에 각각  $1 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 세포를 분주하고 24시간 배양하였다. 1 M HCl, NaOH를 이용하여 pH를 7.4, 6.0으로 맞춘 배지 조건에서 DOX 농도에 맞추어 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도의 MCPEI+PLG 고분자/DOX 용액을 well 당 100  $\mu\text{L}$  부피가 되도록 준비하였고 각 세포에 처리해 준 후 세포 배양 조건에서 배양하였다. 24시간 후 MCPEI+전하 전환성 고분자/DOX 용액을 제거하고 각 well에 혈청 단백질을 함유한 DMEM 배지로 교체해 준 뒤 24시간 추가로 세포 배양 조건에서 배양하였다. MTT/DPBS 용액을 각 well에 처리해준 후 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 생성된 포르마잔 결정을

DMSO를 이용하여 용해시키고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 활성 감소는 DOX 용액을 처리하지 않은 세포와의 상대적 세포 생존율 차이를 통해 확인하였다. 모든 실험은 3배수로 진행하였다.

MCPEI 및 전하 전환성 고분자 기반 약물 전달 시스템의 세포 투과율 확인을 위해 유세포 분석법을 이용하였다. HeLa와 A549 세포에서 실험을 진행하였으며 6 well 세포 배양 플레이트에 well 당  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 분주하고 세포 배양 조건에서 24시간 배양한 뒤 실험을 진행하였다. DOX를 담지한 MCPEI+전하 전환성 고분자/DOX 복합체를 DOX 농도 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 맞추어 준비하고 2가지 조건의 DMEM (pH 7.4, 6.0)을 이용하였다. 먼저 well당 1.5 mL의 배지를 먼저 분주한 뒤 DOX 농도를 맞춘 MCPEI+전하 전환성 고분자/DOX 복합체 용액을 처리해 주고 24시간 동안 세포 배양 조건에서 배양하였다. 이후 ice-cold DPBS로 2회 세척하고 트립신을 이용하여 세포를 떼어내었다. 300  $\mu\text{L}$ 의 DPBS를 이용하여 세포를 잘 분산시키고 flow cytometry BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분석 결과는 Flowing software를 이용하여 정리하였다.

## 제 4 장 결과 및 고찰

### 4.1 PLG의 합성 및 특성 분석

#### 4.1.1 PLG의 합성

NCA (N-Carboxyanhydride)는  $\alpha$ -아미노산과 이산화탄소족 (Carbon dioxide group,  $O=C=O$ )으로 만들어지는 고리형의 무수화물로 다양한 친핵체와의 반응성이 높아 개환 중합의 단량체로 많이 이용된다 [105]. 이 연구에서는 carbobenzyloxy기로 아민기를 차폐한 라이신 (H-Lysine(Z)-OH, Lys(Z))과 benzyl기로 카르복실기의 활성을 차단한 글루탐산 (L-Glutamic acid  $\gamma$ -benzyl ester, BGlu)을 이용하여 Lys(Z)-NCA와 BGlu-NCA를 제조하였다 (Figure 3). 이후에 PEI를 개시제로 하여 개환 중합을 통해 PEI-Lys(Z)를 합성하였다. PEI의 몰수 대비 50배 당량의 Lys(Z)-NCA를 이용하여 3일간 합성 반응을 진행하였다. PLG는 라이신  $\alpha$ -탄소의 아민기부터 글루탐산이 합성될 수 있도록 PEI-Lys(Z)에서 carbobenzyloxy 기가 제거되지 않은 상태에서 반응을 진행하였다 (Figure 4). 글루탐산의 개환 중합 반응은 Lys(Z)-NCA의 개환 중합 반응과 동일한 조건에서 이루어졌으며, BGlu-NCA는 PEI 1 몰당 50배, 70배, 90배, 130배 당량을 이용하여 합성을 진행하였다. 반응 3일 후 carbobenzyloxy 및 benzyl 차폐기의 제거를 위해 33% 브롬화수소를 이용하여 차폐기를 탈착하였다. 투석은 PLG 고분자의 용해성 증진을 위하여 염기성, 0.1 M NaCl 조건에서 3일간 진행하였다.

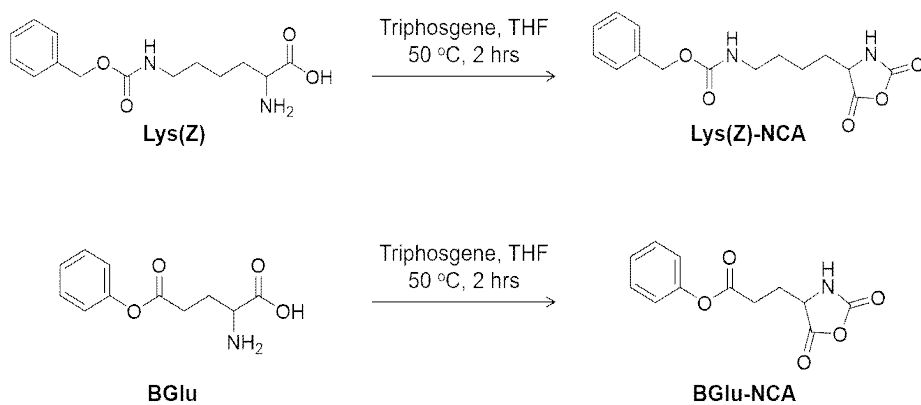


Figure 3. Synthesis scheme of Lys(Z)-NCA and BGlu-NCA.

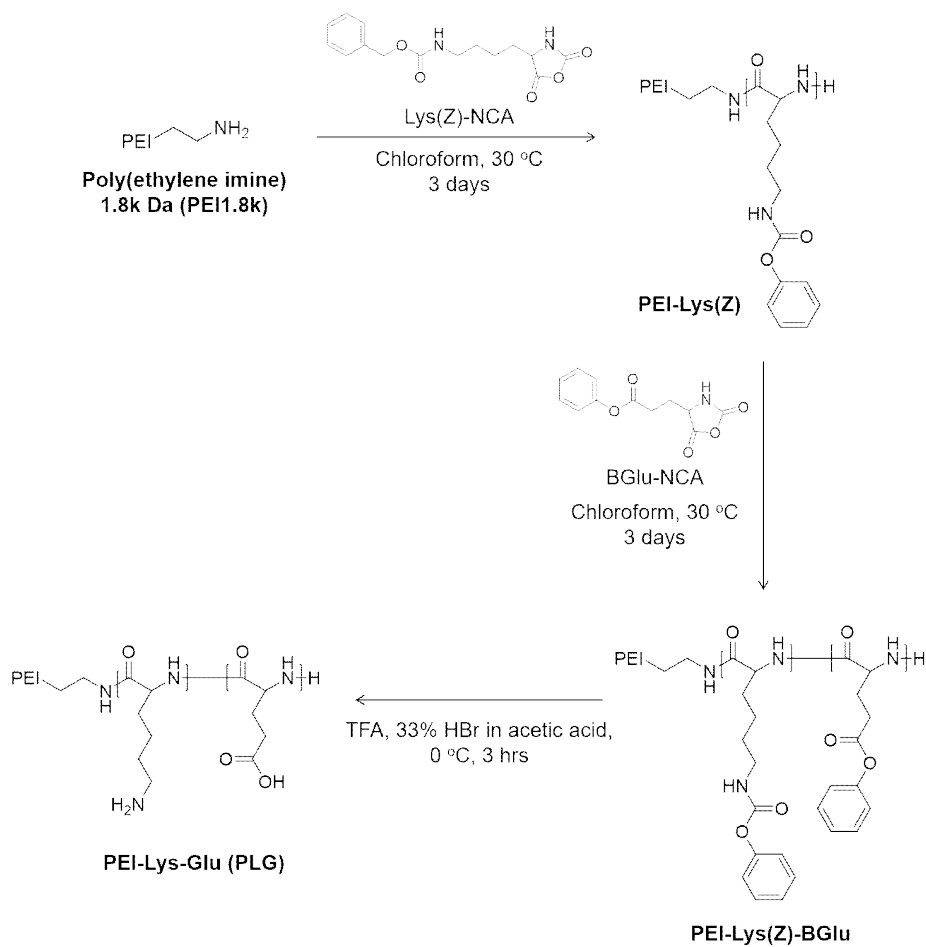


Figure 4. Synthesis scheme of PEI-Lys-Glu (PLG).

#### 4.1.2 $^1\text{H}$ NMR을 이용한 PLG의 구조 분석

NCA 단량체 및 전하 전환성 PLG 고분자의 구조 분석은  $^1\text{H}$  NMR을 이용하였다. 먼저  $^1\text{H}$  NMR을 이용하여 Lys(Z)-NCA 및 BGlu-NCA의 합성을 확인하였다. NCA 구조 형성 전 Lys(Z)과 BGlu의  $\alpha$ -탄소는 3.7 ppm에서 peak가 나타난다. NCA 형성 후에는  $\alpha$ -탄소 peak가 downfield 쪽인 4.3 ppm으로 위치 변경을 하면서 NCA 합성 여부를 확인할 수 있었다. Lys(Z)-NCA의 전환율은 약 97.0%, BGlu-NCA의 전환율은 97.3%임을 확인하였다 (Figure 5).

PEI-Lys(Z) NMR의 각각의 peak는 다음과 같이 분석하였다 (Figure 6). 합성된 Lys(Z) peak와 PEI peak를 이용하여 계산한 결과 PEI 1분자당 51.77개의 Lys(Z)가 부착되었음을 확인하였다.

PEI-Lys(Z);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  ( $-\text{NHCHCO}-$ ) = 4.18 (a),  $\delta$  ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOO}-$ ) = 1.15-1.85 (b, c, d),  $\delta$  ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}-$ ) = 3.11 (e),  $\delta$  ( $-\text{NHCOOC}_6\text{H}_5$ ) = 6.78 (f)

PLG의 각각의 peak는 다음과 같이 분석하였다 (Figure 7).

PLG;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  ( $-\text{NHCHCO}-$ ) = 4.32 (a, f),  $\delta$  ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) = 1.11-1.67 (b, c, d),  $\delta$  ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) = 1.69-1.98 (g),  $\delta$  ( $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) = 2.12 (h),  $\delta$  ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) = 2.89 (e),  $\delta$  ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ) = 2.50-2.82 (PEI)



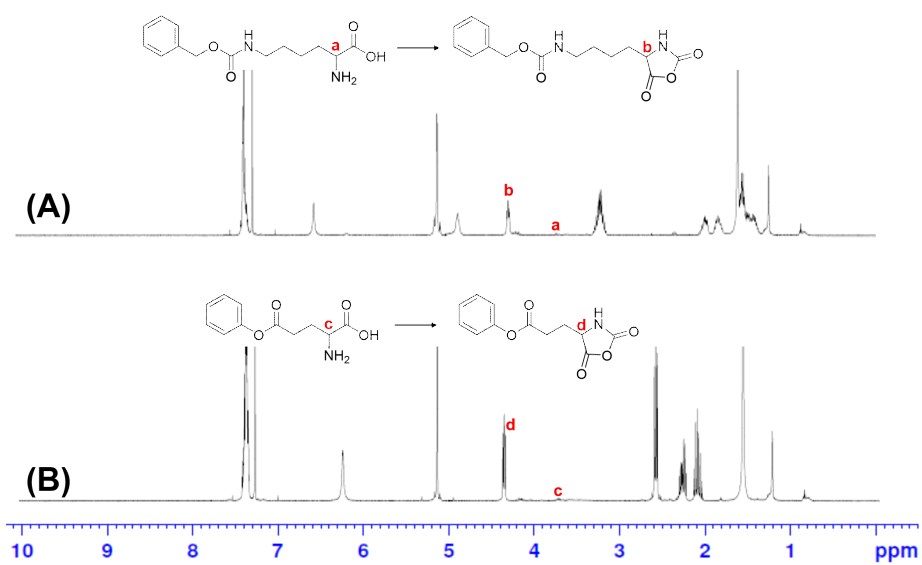


Figure 5.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) Lys(Z)-NCA and (B) BGlu-NCA.

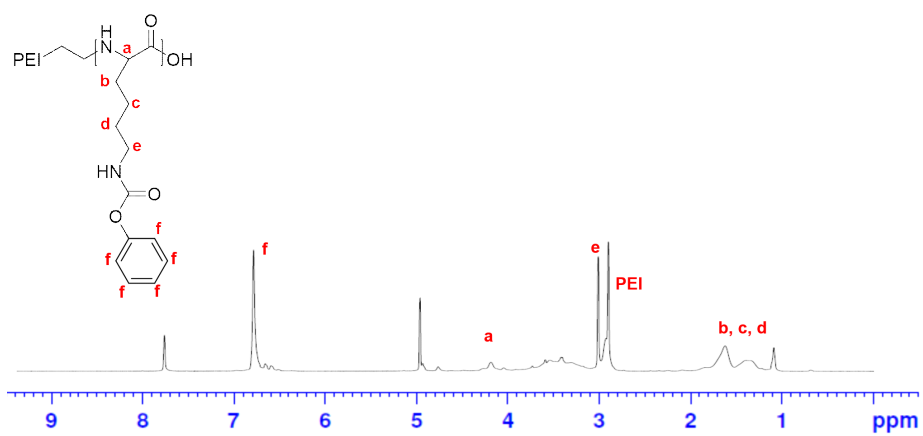


Figure 6.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PEI-Lys(Z).

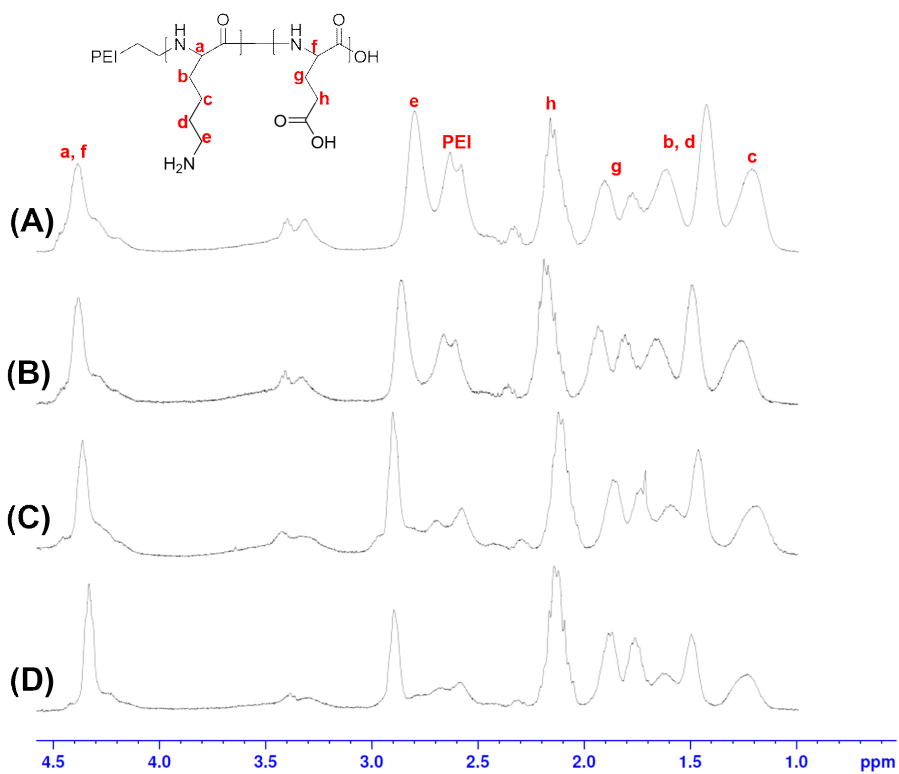


Figure 7.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7.

PLG의 합성 전 PEI-Lys(Z)의 Lys(Z)의 개수에 따라 BGlu-NCA의 feed ratio를 결정하였다. 앞서 확인했듯이 PEI-Lys(Z)의 Lys(Z)은 약 51.8개가 부착되었고, 이를 바탕으로 PEI 1몰 당 BGlu-NCA를 50, 70, 90, 130배 당량이 되도록 넣어주었다.  $^1\text{H}$  NMR을 통해 합성된 PLG 고분자들의 Lys 및 Glu의 비율을 확인한 결과 Lys 대비 각각 1.03, 1.47, 1.81, 2.71의 비율로 합성이 되었음을 확인하였고, 실제 Lys의 개수를 이용하여 Glu의 합성된 개수를 계산한 결과 각각 53.4, 75.9, 93.7, 140.5개의 Glu가 부착되었음을 확인하였고, 이는 실제 feed ratio인 50, 70, 90, 130에 근접한 양을 보여주었다 (Table 1). 이를 통해 PLG 고분자들의 이름을 Lys에 대한 Glu의 비율에 따라 PLG1.0, PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7로 명명하였다.

이 합성에서 사용된 PEI는 분지형의 분자량 1,800 Da를 갖는 PEI로 반복 구조 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ )를 약 41.9개 가지고 있다. 앞서 알려진 바에 의하면 PEI의 1차, 2차, 3차 아민은 각각 1:2:1의 비율로 존재한다 [106]. 따라서 분자량 1,800 Da PEI의 1차 아민은 1분자 당 약 10.5개 존재하고 이는 Lys(Z)-NCA의 개환 중합이 시작되는 지점의 개수라고 볼 수 있다. 앞서 확인했듯이 Lys(Z)가 PEI에 51.8개가 부착되었으므로 하나의 PEI 1차 아민당 4.9개의 Lys(Z)이 합성되었음을 알 수 있다. 같은 방법으로 글루탐산은 PEI의 1가지 당 각각 5.1, 7.3, 9.0, 13.4개가 부착된 것으로 계산되었다. 그리고 라이신의 1차 아민과 PEI에 존재하는 2차, 3차 아민과의 비율을 포함하여 글루탐산 잔기의 카르복실기와의 비율을 계산해보았다. 앞서 설명했듯이 분자량 1,800의 PEI는 41.9개의 아민을 갖고 있고, 이 중 1차 아민 10.5개가 모두 NCA의 개환 중합에 참여하였다고 가정하면 남은 2차, 3차 아민은 31.4개가 된다. 따라서 PLG 고분자에 존재하는

Table 1. Feed ratio, glutamic acid ratio (Glu ratio), the number of glutamic acid (No. of Glu) and anion/cation ratio of PLG polymers. The anion/cation ratio was calculated as the ratio of all amine groups and carboxyl groups in the PLG polymers. All numbers are determined by  $^1\text{H}$  NMR.

	<b>Feed Ratio</b>	<b>Glu Ratio</b>	<b>No. of Glu (51.77 Lys)</b>	<b>Anion/Cation Ratio</b>
<b>PLG1.0</b>	50	1.03	53.4	0.64
<b>PLG1.5</b>	70	1.47	75.9	0.91
<b>PLG1.8</b>	90	1.81	93.7	1.13
<b>PLG2.7</b>	130	2.71	140.5	1.69

모든 아민의 개수는 총 83.2개이며, 이를 이용하여 PLG 고분자들의 양이온과 음이온 사이의 비율을 계산하면 각각 0.64, 0.91, 1.13, 1.69로 계산되었다.

#### 4.1.3 SEC를 이용한 PLG의 분자량 확인

SEC를 이용하여 앞서 합성한 PLG 고분자의 분자량을 측정하였다. PEG를 스탠다드로 활용하였고, 이를 이용하여 보정한 분자량 값은 Table 2에 자세하게 나타내었다. PEI-Lys에서 글루탐산이 합성되면서 분자량이 증가하는 결과를 확인할 수 있었다. 그리고 PLG의 경우 글루탐산의 비율이 증가할수록 중량 평균 분자량 또한 함께 증가하는 경향을 확인하였다.

#### 4.1.4 PLG의 세포 대사 활성 확인

유전자 및 약물 전달 시스템으로 응용되는 고분자는 세포 독성이 적을수록 부작용을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 특히 유전자 및 약물 전달체로 많이 사용되는 PEI25k의 경우 높은 분자량과 양이온성 때문에 일반적으로 세포 독성이 크게 나타나는 것으로 알려져 있다 [107]. PEI에 의한 세포 독성은 PEI와 약물 및 유전자 복합체에 의한 독성과 복합체를 형성하지 못하거나 복합체로부터 해리된 고분자에 의한 독성으로 나뉜다. 특히 후자의 경우 체내 혈청 단백질과의 상호작용을 통해 즉각적인 독성이 나타나 온전한 세포 사멸 효과를 저해한다 [108]. 이에 많은 연구들이 세포 독성을 줄이기 위해 상대적으로 작은 분자량을 갖는 PEI를 접합하여 이용하거나 특정 조건에서 분해되는 고분자를 응용하는 등 다양한 방법을 이용하여 세포 독성을 극복하기 위한 연구를 진행하고 있다 [26, 27, 109].

Table 2. SEC results of PEI-Lys and PLG polymers.

	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Predicted MW by <math>^1\text{H}</math> NMR</b>
<b>PEI-Lys</b>	$8.10 \times 10^3$	$1.21 \times 10^4$	9,386
<b>PLG1.0</b>	$1.15 \times 10^4$	$1.53 \times 10^4$	18,994
<b>PLG1.5</b>	$1.19 \times 10^4$	$1.63 \times 10^4$	23,036
<b>PLG1.8</b>	$1.24 \times 10^4$	$2.13 \times 10^4$	26,254
<b>PLG2.7</b>	$1.03 \times 10^4$	$2.23 \times 10^4$	34,677

본 연구에서는 합성한 전하 전환성 고분자 자체의 세포 대사 활성을 먼저 확인하였다 (Figure 8-12). 각 고분자는 pH 7.4, 6.0과 혈청 단백질 유무 조건에서의 세포 대사 활성을 확인하였으며, PEI25k를 대조군으로 하여 실험을 진행하였다. HeLa 세포에서 PLG1.0은 약간의 세포 대사 활성 감소를 나타내었다. 혈청 단백질이 있는 pH 6.0 조건에서 고분자의 농도가 60  $\mu\text{g/mL}$ 에 이르자 60% 수준의 세포 생존율이 확인되었다. PLG1.5, 1.8, 2.7의 경우 일부 고농도에서의 세포 생존율을 제외하면 혈청 단백질 유무와 pH 조건에 관계없이 80% 이상의 높은 세포 생존율을 나타냈다. 특히 PLG1.0의 경우 다른 PLG 기반의 고분자들에 비해 높은 세포 대사 활성 감소가 나타났는데, 이는 PLG1.0이 다른 PLG 고분자들에 비해 높은 양이온성 비율을 갖고 있기 때문이라고 보인다. 그리고 PLG 고분자의 경우 분자량에 따른 세포 대사 활성 감소가 나타나지 않았다. 만약 PLG 고분자의 분자량이 세포 대사 활성에 영향을 미쳤다면 분자량이 가장 높은 PLG2.7의 경우 다른 PLG 고분자에 비해 높은 세포 대사 활성 감소가 나타내야 했지만 실제 PLG2.7의 경우 80% 수준의 양호한 상대적 세포 생존율을 나타내었다. PLG1.8은 A549에서 세포 대사 활성 평가 실험도 진행하였다. PLG1.8은 HeLa 세포에서의 실험 결과와 마찬가지로 A549에서도 80% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내었다.



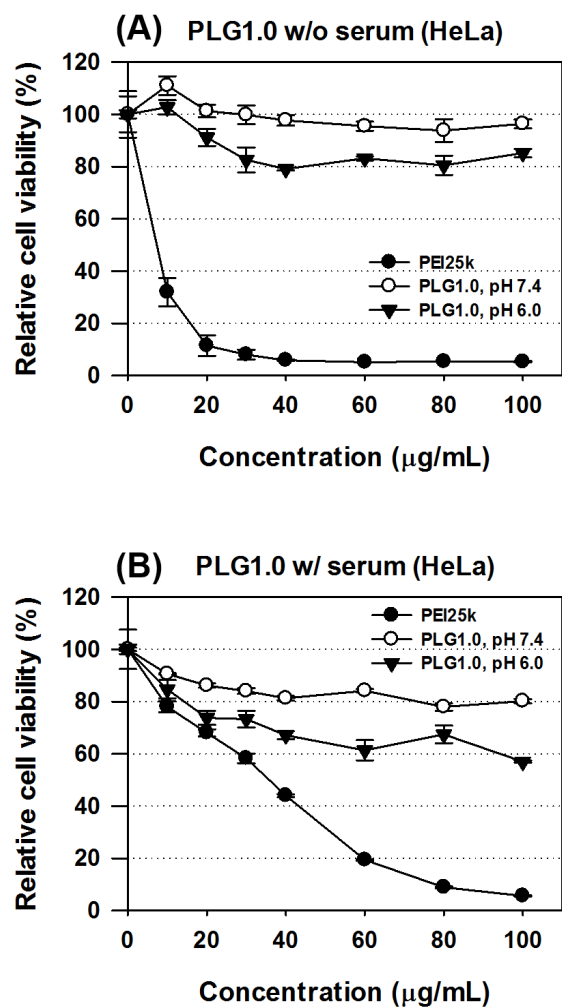


Figure 8. MTT assay results of PLG1.0 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 µg/mL).

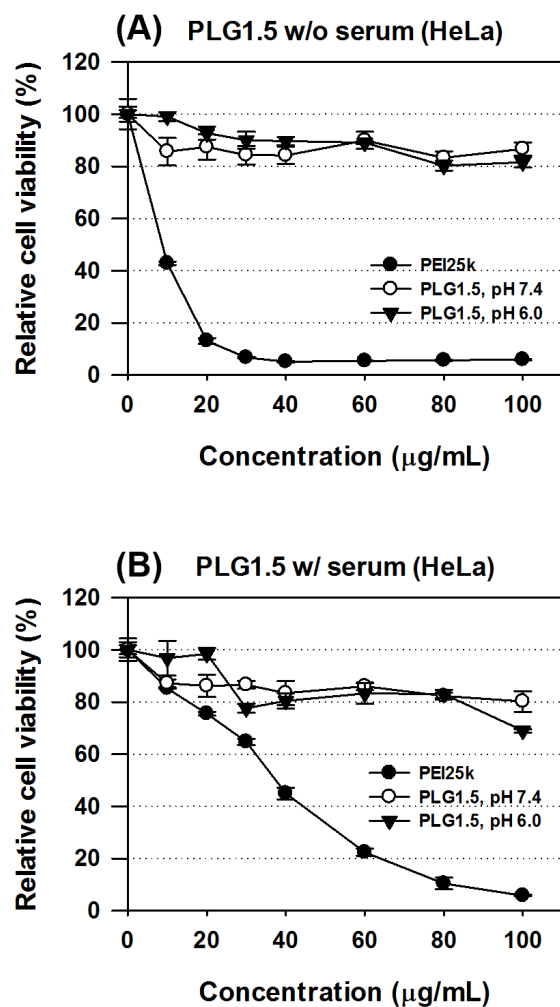


Figure 9. MTT assay results of PLG1.5 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 µg/mL).

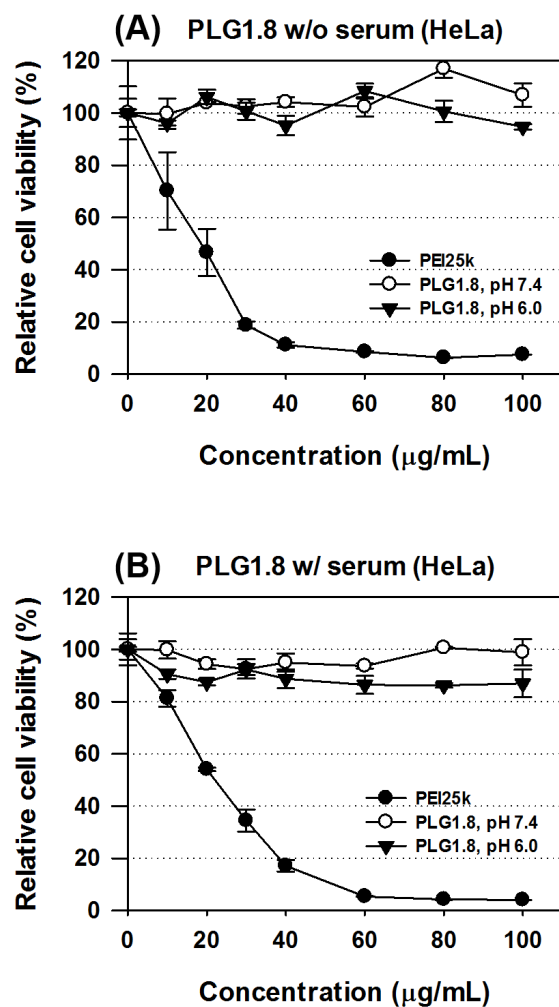


Figure 10. MTT assay results of PLG1.8 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

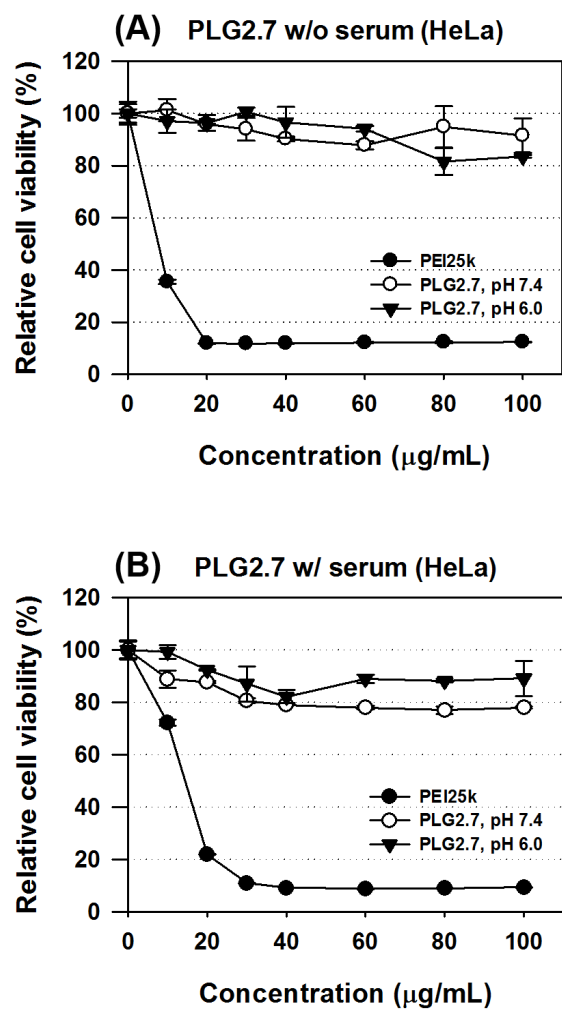


Figure 11. MTT assay results of PLG2.7 in HeLa cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 µg/mL).

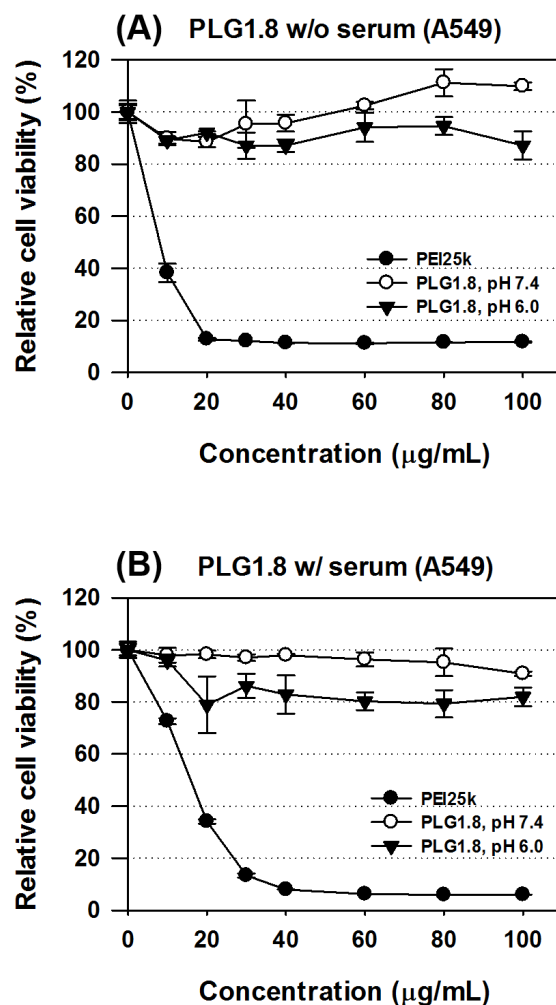


Figure 12. MTT assay results of PLG1.8 in A549 cells (A) without serum, (B) with serum at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 µg/mL).

#### 4.1.5 PLG의 산-염기 적정

폴리펩타이드 기반의 고분자인 PLG는 라이신과 글루탐산으로 구성되어 있는 고분자로써 라이신 및 글루탐산의 잔기인 아민기와 카르복실기는 각각의 양성자화, 탈양성자화에 의해 이온 성질을 갖는다. 본 연구에서는 PLG 고분자의 산-염기 적정 실험을 통해 pH에 따른  $pK_a$  값의 측정 및 이온화 거동을 예측하였다. pH 적정은 글루탐산 잔기가 많을수록 대체로 완충 효과가 크게 나타났다 (Figure 13). 그리고 적정 결과를 바탕으로  $pK_a$  값을 확인하였다. 음이온/양이온의 비율이 낮은 PLG1.0과 PLG1.5는  $pK_a$  값이 6.5를 나타내었고, 음이온/양이온의 비율이 높은 PLG1.8과 PLG2.7의  $pK_a$  값은 각각 5.8, 5.7임을 확인하였다.

또한 산-염기 적정 결과를 이용하여 각 PLG 고분자의 완충용량을 측정하였다. PLG 고분자의 완충용량은 양성자화 가능한 아민 당 각각 0.17, 0.21, 0.32, 0.67  $\mu\text{mol}$  HCl과 PLG 고분자의 mg 당 0.75, 0.75, 1.0, 1.63  $\mu\text{mol}$  HCl을 나타내었다. PLG 고분자는 글루탐산의 비율이 증가할수록 동일 질량 내에 존재하는 양성자화 가능한 아민의 수는 줄어든다. 그러나 산-염기 적정을 통해 확인한 결과 글루탐산의 비율이 증가할수록 완충용량 역시 증가하였다. 이를 통해 글루탐산도 산-염기 적정 과정에서 양성자화되는 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

#### 4.1.6 PLG의 입자성 확인

PLG 고분자는 라이신과 글루탐산을 갖고 있어 서로의 상호작용을 통해 입자를 형성할 가능성이 있다. 먼저 서로 다른 pH 조건에서 투과도 측정을 통해 입자성 확인을 진행하였다. 각각의 고분자는

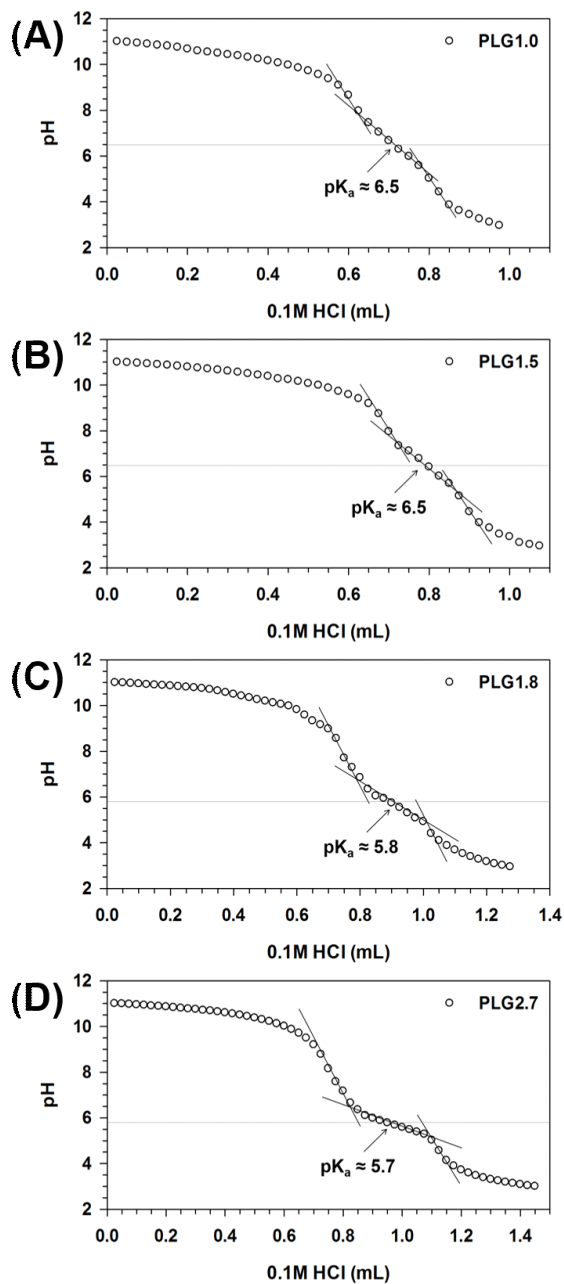


Figure 13. Acid-base titration of PLG polymers. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 (D) PLG2.7

pH 11부터 pH 3까지 0.5 단위로 적정하며 해당 pH에서 투과도 측정을 하였다 (Figure 14). PLG1.0은 pH 10, PLG1.5는 pH 8, PLG1.8은 pH 6, PLG2.7은 pH 5에서 가장 낮은 투과도를 확인할 수 있었다. 글루탐산의 비율이 높을수록 산성 조건에서 PLG 고분자의 입자 형성이 촉진되었다. 라이신과 글루탐산 R 그룹의 pKa 값은 각각 4.3, 10.3 이고, pH 4.3과 10.3 사이에서의 PLG 고분자 R 그룹의 아민과 카르복실기는  $-NH_3^+$ 와  $-COO^-$  형태로 존재한다. 따라서 PLG 고분자의 net charge가 0이 되는 pH에서 분자간 소수성 상호작용으로 인한 응집으로 입자가 형성되고 이는 글루탐산 비율에 따라 서로 다른 pH에서 일어남을 확인하였다.

PLG1.8을 이용하여 pH에 따른 고분자의 입자 형성을 확인하였다 (Figure 15). PLG1.8은 PEI 하나의 가지 당 약 4.9개의 라이신과 9.0개의 글루탐산을 갖고 있어 분자 사이의 상호작용에 의한 입자의 형성이 가능할 것이라 생각하였고, DLS를 통해 입자의 형성을 확인하였다. PLG1.8은 pH 10에서 약 250 nm 크기와 -35.0 mV의 제타 전위 값을 갖는 입자를 형성하였고, pH가 중성에 가까워짐에 따라 입자의 크기가 커지면서 pH 7에서는 1026 nm의 크기와 +6.1 mV의 제타 전위 값을 갖는 입자를 형성하였다. 이후 pH가 산성으로 변화하면서 입자의 크기가 다시 줄어들며 제타 전위 값은 양의 값으로 전환되어 pH 3에서는 363 nm, 27.5 mV의 크기 및 제타 전위 값을 갖는 입자를 형성하였다. 이는 PLG 고분자의 입자 형성이 pH에 따라 두 가지 형태로 일어남을 의미한다. 산성, 염기성 조건 (Figure 16 (A))에서는 라이신과 글루탐산의 R 그룹 사이의 정전기적 인력에 의한 입자의 형성이 이루어지는 반면 [110-112], 중성의 pH 조건 (Figure 16 (B))에서는 앞서 산성 혹은 염기성 조건에서 형성된 입자의



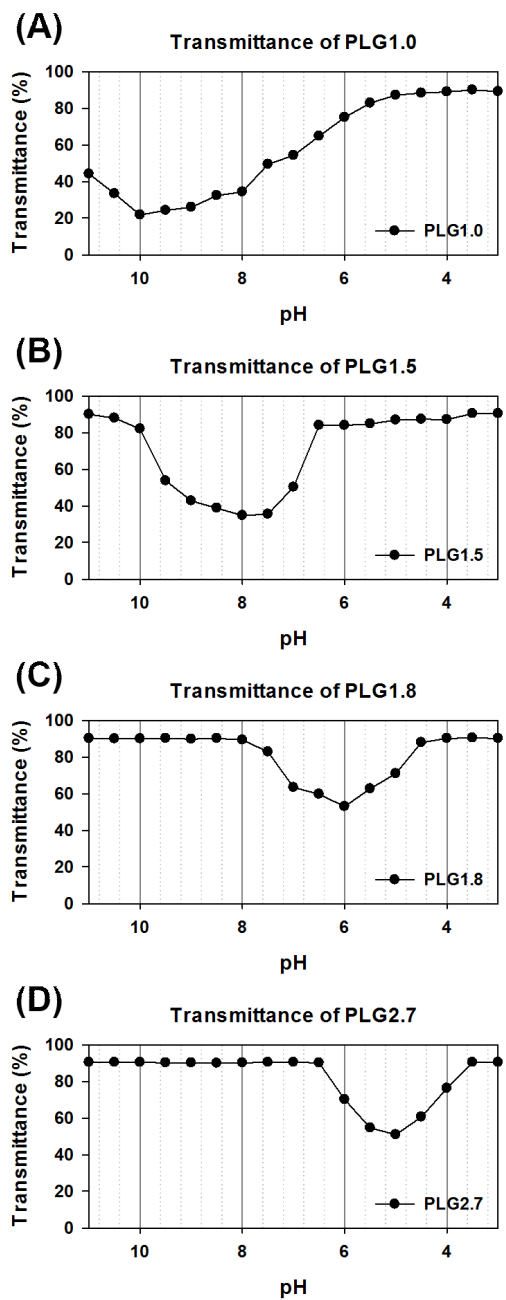


Figure 14. Transmittance of PLG polymers. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8, (D) PLG2.7

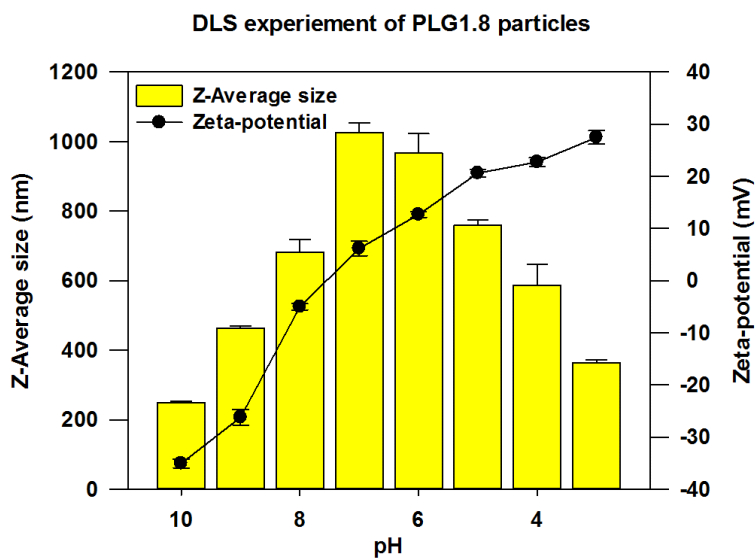


Figure 15. Average sizes and zeta-potentials of PLG1.8 polymers with various pH conditions.

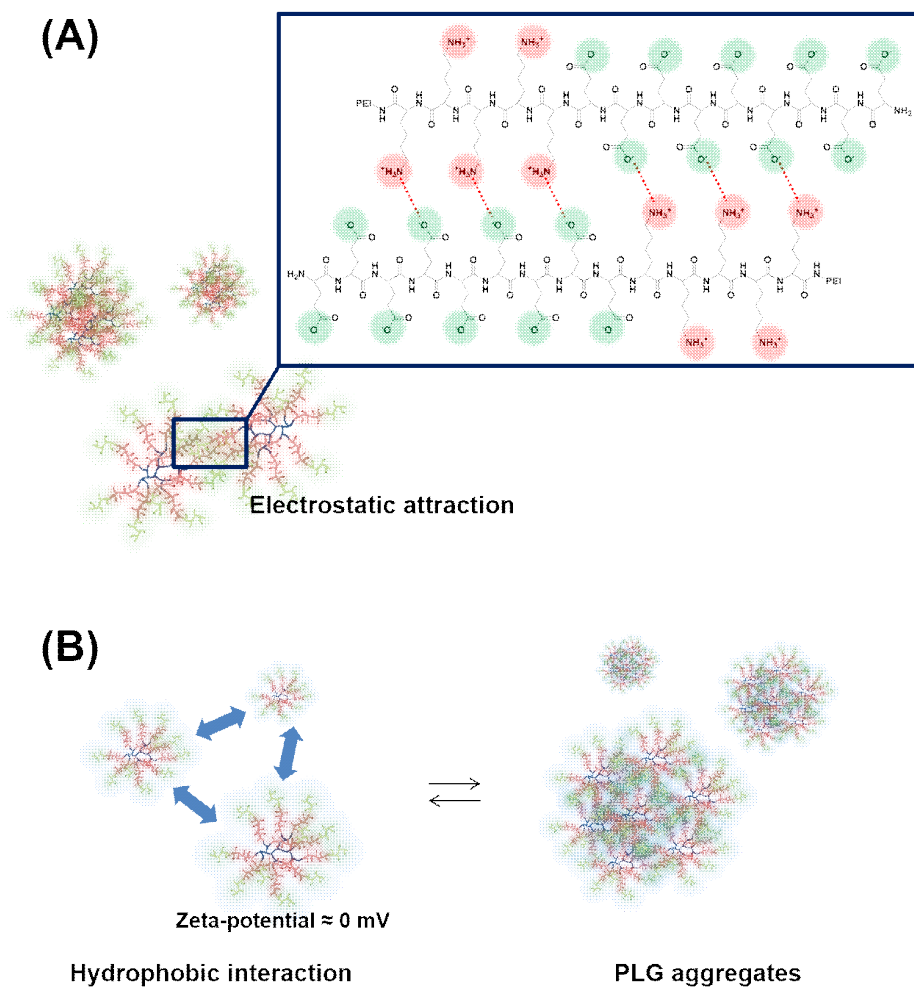


Figure 16. Schematics of PLG1.8 particle formation at (A) acidic, basic pH conditions, (B) neutral pH condition.

제타 전위 값이 0에 가까워지면서 소수성 상호작용에 의해 더 큰 입자가 형성되었음을 확인하였다.

## 4.2 PLG를 이용한 유전자 전달 시스템

### 4.2.1 PLG 폴리플렉스의 형성 및 특성 분석

PLG는 유전자 전달의 대표적 고분자인 PEI를 중심으로 라이신과 글루탐산으로 이루어진 가지를 갖고 있는 구조를 이룬다. 이러한 구조는 외부 pH에 따라 라이신 아민기의 양성자 탈착, 그리고 글루탐산 카르복실기의 양성자 탈착에 의한 전하 전환성을 가질 것으로 예측하였다. 이 연구에서는 이러한 PLG의 특성에 기초하여 고정된 PEI-Lys의 양이온 비율에 대한 글루탐산의 양을 늘려가면서 유전자 전달체의 다양한 음이온성 부여를 통해 혈청 단백질에 대한 저항성과 pH 변화에 대한 세포 사멸 효과 증진 및 유전자 전달에 적합한 음이온성 비율에 대한 연구를 진행하였다.

PLG 고분자의 유전자 전달체로써 응용을 확인하기 위해 먼저 아가로스 겔 전기영동 실험을 통해 폴리플렉스 형성 능력을 살펴보았다 (Figure 17). PLG1.0과 PLG1.5는 무게비 5 이하에서 pDNA와 폴리플렉스를 형성함을 확인하였다. PLG1.0과 PLG1.5는 PLG 고분자 중 양이온성이 상대적으로 높은 고분자로 정전기적 인력에 의한 폴리플렉스 형성이 낮은 무게비에서 효율적으로 이루어졌다. 반면에 PLG1.8의 경우 무게비 40 이후부터 유전자와 폴리플렉스를 형성하였다. PLG1.8은 PLG1.0과 PLG1.5에 비해 글루탐산 잔기를 각각 40.3개, 17.9개 더 많이 갖고 있기 때문에 음이온성을 갖는 pDNA와 폴리플렉스를 형성하는데 조금 더 많은 고분자가 필요하였을 것으로

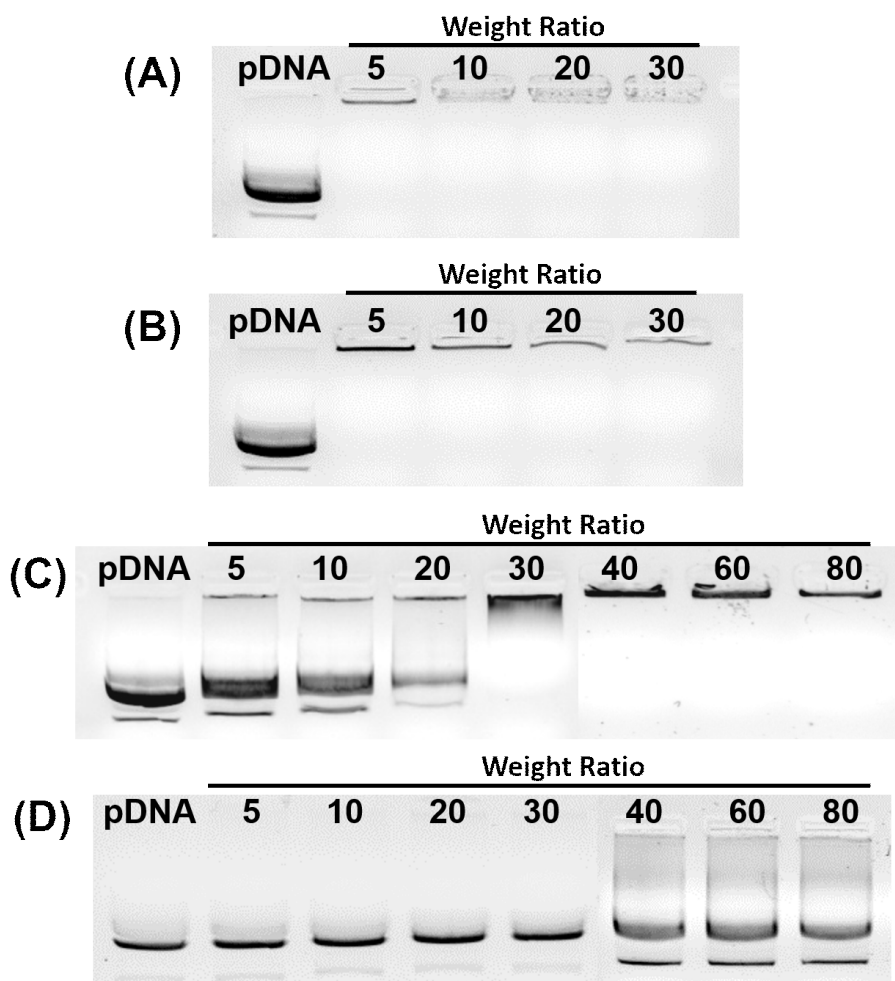


Figure 17. Agarose gel electrophoresis results of PLG polyplexes. (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8, (D) PLG2.7.

생각되었다. PLG2.7은 매우 높은 무게비에서도 pDNA와 폴리플렉스를 형성하지 못하는 것으로 확인하였다.

PLG1.8의 폴리플렉스 형성 과정에 대한 고찰을 위해 산성 조건에서 아가로오스 겔 전기영동 실험을 진행하였다 (Figure 18 (A)). 앞서 실시한 아가로오스 겔 전기영동 실험에서 PLG1.8 고분자는 중성 조건에서 pDNA에 대한 무게비 40에서 pDNA와 성공적으로 폴리플렉스를 형성하였다. 만약 PLG1.8 고분자가 정전기적 인력을 통해 pDNA와 폴리플렉스를 형성한다면 산성 조건에서 PLG1.8의 양이온성 증가로 인하여 더 낮은 무게비에서도 폴리플렉스를 형성할 수 있을 것으로 예측하였다. 산성 조건인 pH 5.0에서 아가로오스 겔 전기영동을 실시한 결과 pDNA에 대한 무게비 10에서 폴리플렉스 형성이 시작되는 것을 확인할 수 있었고, 이는 PLG1.8 고분자가 phosphate 결합에 의해 음이온성을 갖는 pDNA와 정전기적 인력을 통하여 polyplex를 형성하는 것으로 볼 수 있다.

또한 유전자의 내부에 intercalation되는 PicoGreen을 이용하여 유전 물질의 유무를 확인하는 분석 방법인 PicoGreen 실험을 통해 폴리플렉스 내 유전자의 위치를 확인하였다 (Figure 18 (B)). PicoGreen 실험 결과 무게비 40에서 상대적 형광 값이 폴리플렉스를 형성하지 않은 pDNA에 대하여 28.9%를 나타내며 폴리플렉스의 형성이 시작되는 것을 볼 수 있었고, 무게비 60에서는 15.6%, 무게비 100에서는 11.2%의 상대적 형광값을 보이며 폴리플렉스가 유전자를 보호하고 있음을 보여주었다. 이를 통해 pDNA가 정전기적 인력에 의해 폴리플렉스를 형성하고 있으며 폴리플렉스에서 유전자는 고분자의 내부에 위치하고 있다는 것을 확인하였고, 폴리플렉스의 형성 과정을 다음의 그림으로 나타내었다 (Figure 19).

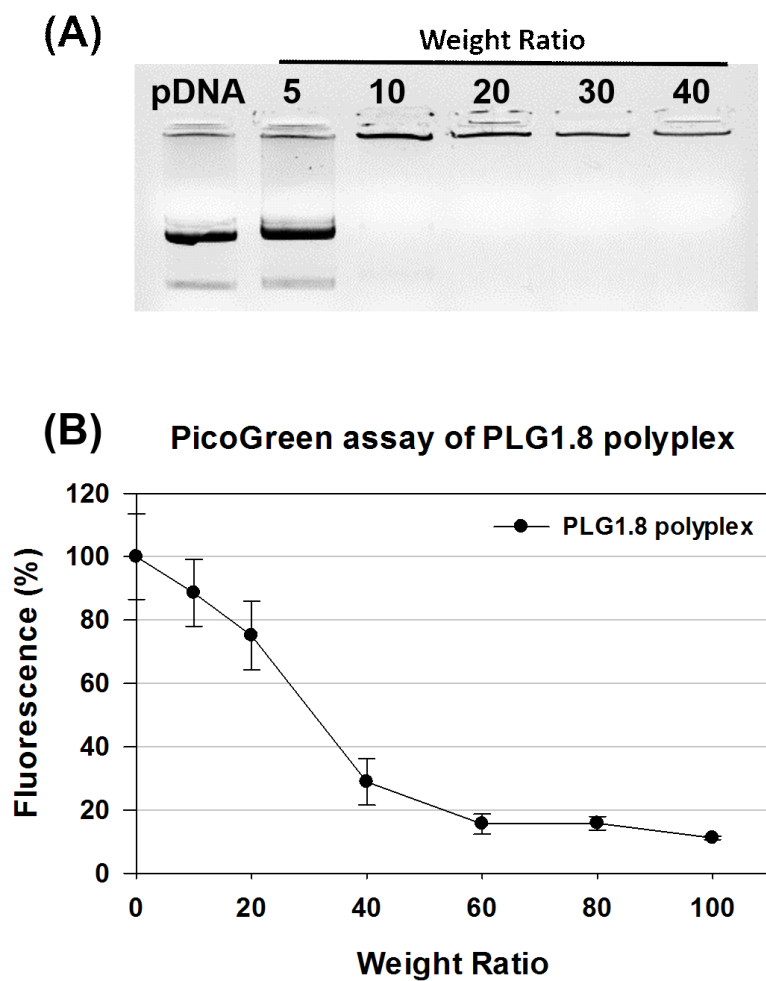


Figure 18. (A) Agarose gel electrophoresis result of PLG1.8 polyplex at acidic condition (pH 5.0), (B) PicoGreen assay of PLG1.8 polyplex.

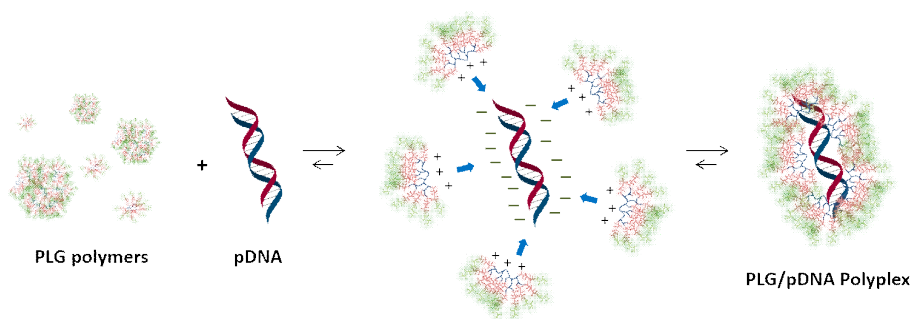


Figure 19. Schematics of PLG/pDNA polyplex formation.



DLS를 이용하여 pH에 따른 PLG1.5, PLG1.8 폴리플렉스의 크기와 표면 전하의 변화를 측정하였다 (Figure 20, 21). 먼저 PLG1.5는 pH 7.4에서 150 nm 이하의 크기와 -20mV 이하의 제타 전위 값을 갖는 안정적 입자를 형성하다가 pH 6.0에서는 무게비 20부터 200~400 nm의 크기와 양의 제타 전위 값을 입자로 전환되었다. PLG1.8의 경우 pH 7.4에서 폴리플렉스의 사이즈는 400 nm 이하의 크기를 갖고 있으며 표면 전하는 -30 mV 이하의 음전하를 띄고 있었다. pH 6.0에서는 폴리플렉스 입자의 크기가 200 nm 이하로 더욱 안정되는 모습을 나타내며 pDNA에 대한 무게비에 따라 표면 전하가 점차 증가하였다. 특히 pH 6.0 조건의 pDNA 대비 무게비 80 폴리플렉스의 경우 표면 전하가 0에 가까워지면서 폴리플렉스 입자들끼리의 응집 현상이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. pH 6.0 조건에서의 무게비 100 폴리플렉스는 표면 전하가 양의 값으로 전환되면서 다시 200 nm 이하의 크기를 갖는 안정적인 폴리플렉스 형태로 돌아오는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 22).

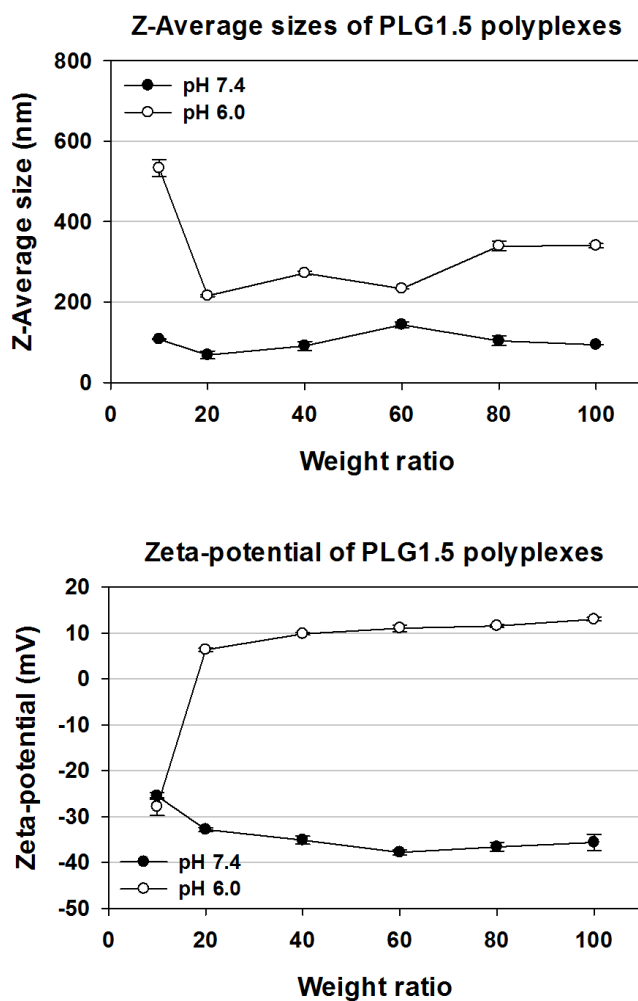


Figure 20. Average sizes and zeta-potentials of PLG1.5 polyplexes with different pH conditions (pH 7.4, 6.0) at various weight ratios of polymer/pDNA (10, 20, 40, 60, 80, 100).

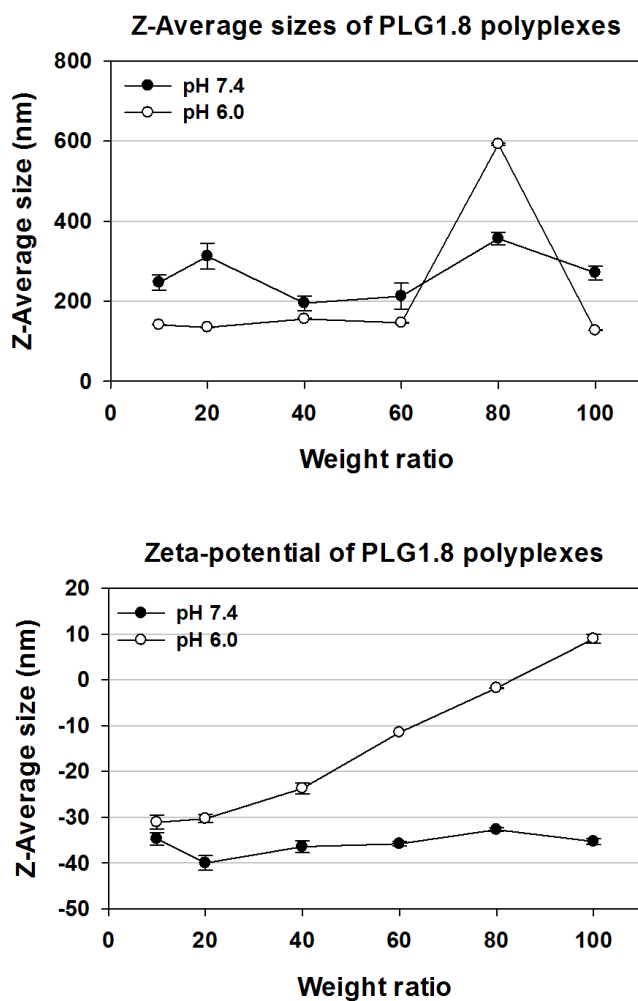


Figure 21. Average sizes and zeta-potentials of PLG1.8 polyplexes with different pH conditions (pH 7.4, 6.0) at various weight ratios of polymer/pDNA (10, 20, 40, 60, 80, 100).

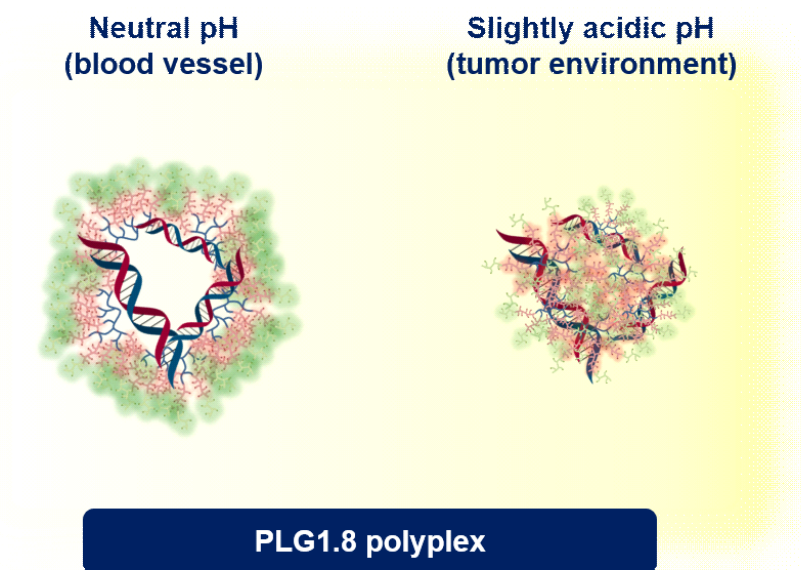


Figure 22. Schematics of PLG1.8 polyplex at neutral and slightly acidic pH conditions.

#### 4.2.2 pH에 따른 PLG 폴리플렉스의 transfection 효율 평가

pH 감응성을 갖는 PLG를 이용하여 외부 pH 조건을 변경하면서 유전자 전달과 transfection 효율을 확인하였다. PLG 고분자 중 PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7을 이용하여 실험을 진행하였다. 먼저 HeLa 세포에서 PLG1.5를 사용하여 진행한 결과를 보면 대조군인 PEI25k의 경우 혈청 단백질이 있는 DMEM 조건에서 혈청 단백질이 없는 조건 대비 transfection 효율이 pH에 따라 각각 6.7배, 3.2배 가량 감소하였다 (Figure 23). 그리고 약산성 조건에서의 transfection 효율은 혈청 단백질 유무에 따라 각각 3.9배, 1.8배 가량 감소하였다. 반면 PLG1.5의 경우 무게비 60, 80 폴리플렉스는 혈청 단백질 유무에 관계없이 약산성 조건에서 transfection 효율이 증가하였다. 특히 혈청 단백질이 있는 조건에서 PLG1.5 무게비 60의 폴리플렉스는 pH 7.4에서의 RLU/mg protein 값 대비 8배 가량 증가하였다. PLG1.5의 경우 본 실험을 통해 혈청 단백질에 대한 저항성과 약산성 조건에서 transfection 효율이 증가함을 확인하였으나 PEI25k에 비해 낮은 수준의 단백질 발현 효율이 나타났다.

PLG1.8을 이용한 transfection 실험은 PLG1.5에 비해 약산성 조건에서 더 발전된 결과가 나타났다 (Figure 24). PEI25k는 앞선 실험과 마찬가지로 혈청 단백질이 있는 조건, 약산성 조건에서 혈청 단백질이 없는 중성 조건보다 유전자 전달에 의한 단백질 발현 효율이 약 50배 가량 크게 감소하는 경향이 나타났다. 그러나 PLG1.8의 경우 혈청 단백질이 없는 약산성 조건에서 transfection 효율이 무게비에 따라 각각 5.1, 28.4, 54.5배 증가하였다. 혈청 단백질이 있는 조건에서는 무게비 100 폴리플렉스는 약산성에서 효율이 0.7배로 감소하였지만, 무게비 60, 80 폴리플렉스는 3.9, 23.1배 증가하였다. 특히 혈청

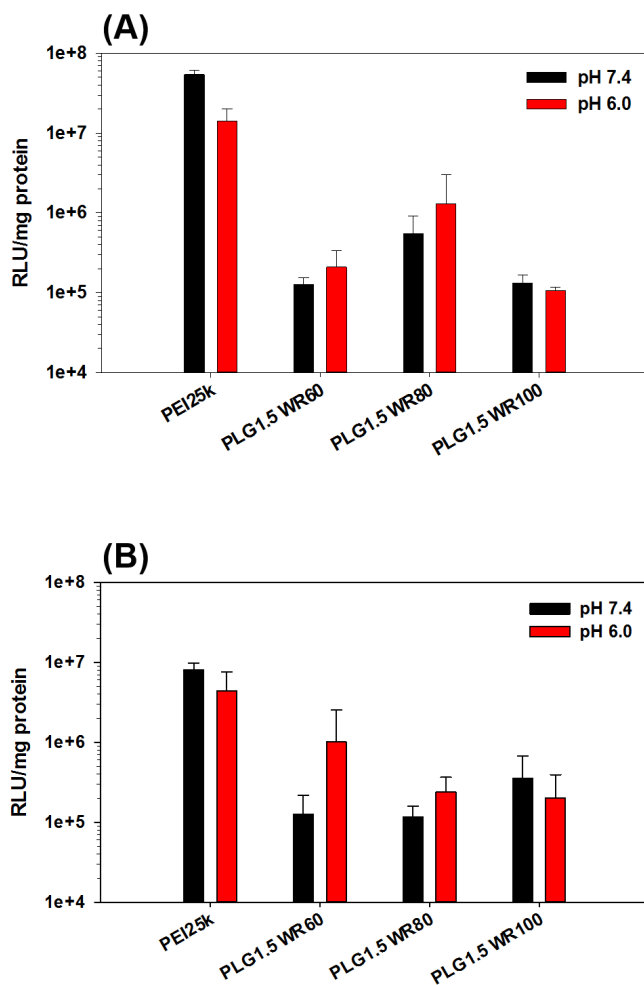


Figure 23. Transfection experiment results of PLG1.5 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1.

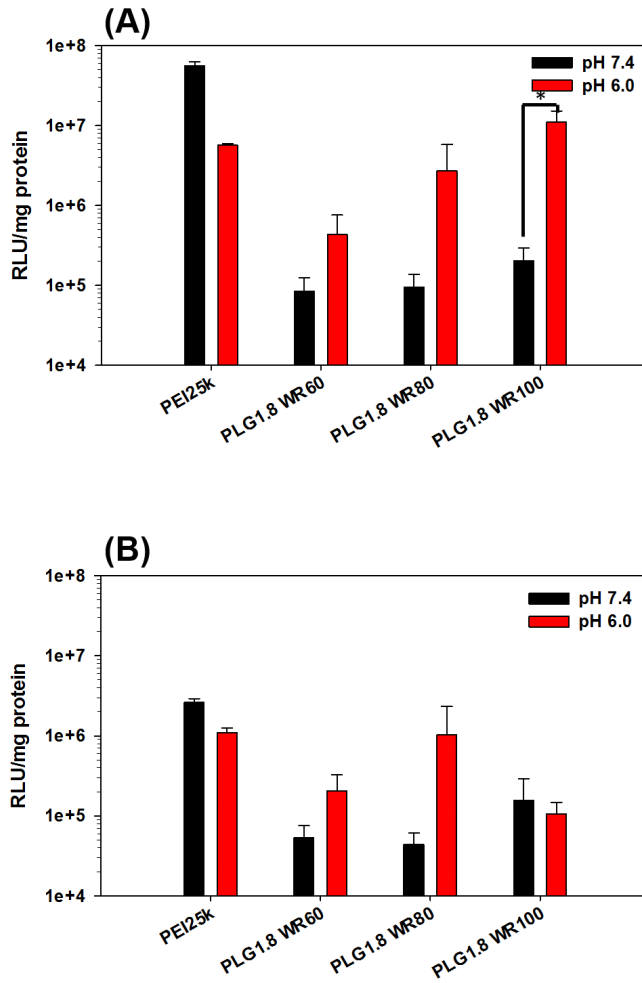


Figure 24. Transfection experiment results of PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05)

단백질이 없는 약산성 조건에서는 PEI25k에 비해 1.9배 증가하는 결과를 확인하였다. 앞서 PLG1.8 폴리플렉스의 DLS 실험 결과 (Figure 21)를 보면 pH 6.0에서 크기가 200 nm 이하로 감소하며, 표면 전하는 점차 증가하는 경향을 확인하였고, 폴리플렉스가 약산성 조건에서 세포 투과에 더 유리한 방향으로 변화한다는 것을 유추할 수 있었다. 이는 transfection 결과를 통해서도 확인할 수 있었다. PLG1.8 폴리플렉스는 A549에서 transfection 실험을 진행하였고, HeLa 세포주와 유사한 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 25). 특히 A549에서는 혈청 단백질이 있는 조건에서 더 나은 결과를 나타냈다. 무게비 60 폴리플렉스의 단백질 발현은 생체 pH 조건 대비 약산성 조건에서 0.5배 감소하였으나 무게비 80과 100의 폴리플렉스를 이용한 transfection 결과는 각각 37.9, 91.8배 증가하였다.

PLG1.5와 PLG1.8을 이용한 transfection 결과에서 눈여겨볼 점은 약산성 조건에서의 단백질 발현 효율의 변화이다. 앞의 문헌 연구 2.2.1에서 설명했듯이 암 세포와 그 주변 조직은 혐기성 조건에서 왕성한 대사 활동으로 인한 대사 산물의 영향으로 산성을 나타낸다고 알려져 있다 [62]. PEI25k를 이용한 transfection 실험은 세포주, 혈청 단백질 유무에 관계없이 약산성 조건에서 유전자 전달에 의한 단백질 발현 효과가 떨어진다는 것을 확인하였다. 그러나 pH 감응성을 갖는 전하 전환성 고분자인 PLG1.5와 1.8은 일부 무게비의 폴리플렉스를 제외하고 대체로 약산성 조건에서 일반 생체 pH보다 유전자 전달 효율이 크게 증가하였다. 이는 유전자 치료를 위한 전달체 연구에서 산성 조건의 종양 조직에서 유전자의 전달 효율을 증진시키는 것뿐만 아니라 일반 정상 조직 pH에서 음이온성 증가로 혈청 단백질에 대한 저항성을 늘리고 음이온으로 하전된 세포막에



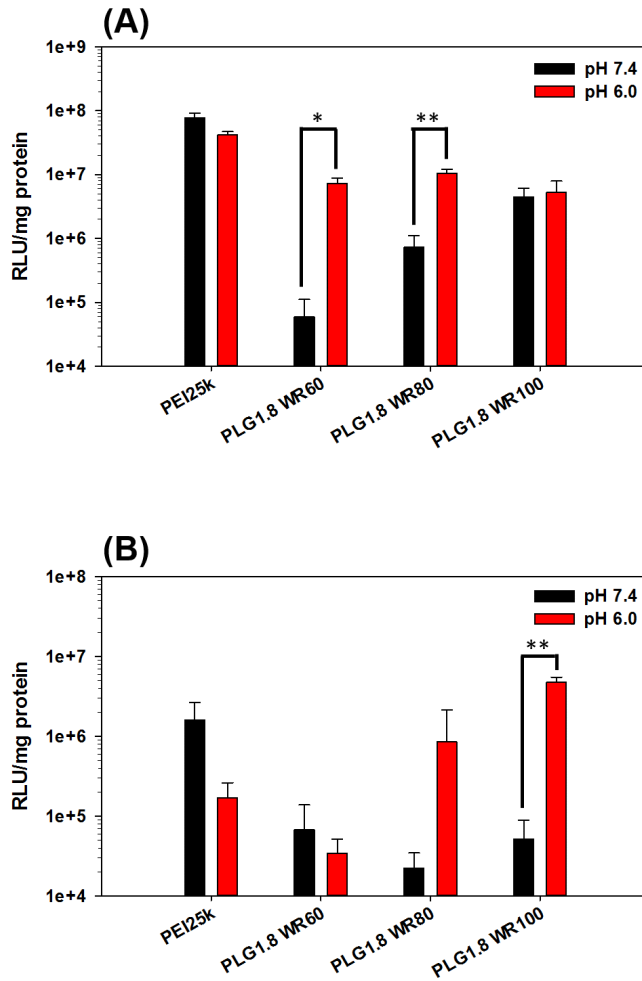


Figure 25. Transfection experiment results of PLG1.8 polyplexes in A549 cells (A) without serum and (B) with serum conditions, respectively. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01)

정전기적 반발력에 의한 투과 감소로 인한 유전자 전달 효율을 억제하는 효과 또한 기대할 수 있다는 점을 시사한다. 즉, PEI25k와 같이 모든 세포, 모든 조건에서 특히 생체 pH 조건에서 유전자 전달에 의한 단백질 발현 효율이 높은 전달체는 종양에 대한 암세포 사멸 효과와 함께 일반 세포에 대한 부작용의 가능성도 높아질 수 있다. 하지만 PLG 고분자와 같은 pH 감응성을 갖는 유전자 전달체를 이용하면 PEI25k 대비 특정 pH 조건에서의 높은 전달 효과를 기대할 수 있으므로 암세포 사멸 효과는 높이고 부작용의 가능성은 줄일 수 있다는 장점이 있다.

PLG1.5와 PLG1.8은 음이온/양이온 비율 값이 각각 0.91, 1.13 이었다. 음이온과 양이온의 비율 값 1을 기준으로 PLG1.5는 약한 양이온성, PLG1.8은 약한 음이온성을 갖는다고 볼 수 있다. 이때 약한 양이온성을 갖는 PLG1.5는 pH에 따른 약산성에서의 향상된 효과는 보였지만 혈청 단백질에 대한 상대적으로 낮은 저항성과 PEI25k 대비 낮은 유전자 전달 효율을 나타내었다. 약한 음이온성을 갖는 PLG1.8은 음이온성으로 인한 혈청 단백질의 저해 효과 극복 및 더 나은 전하 전환성을 통한 약산성에서의 유전자 전달 효과 증진까지 유전자 전달 시스템 목적의 연구에서 더 나은 결과를 나타내었다. 결과적으로 transfection 실험을 통해 pH 감응성을 갖는 전하 전환성 PLG 고분자 중 PLG1.8의 효과가 제일 뛰어남을 확인하였다.

Bafilomycin A1은 vacuolar-type  $H^+$  ATPase의 억제제로 세포의 엔도솜 내 양성자 펌프의 작동을 정지시키는 역할을 하여 유전자 전달에서 전달 기작에 관한 연구를 하는데 많이 이용되는 물질이다 [51, 113, 114]. Transfection 과정에서 엔도솜의 완충 효과 확인을 위해 bafilomycin A1을 처리한 후 실험을 진행하였다 (Figure 26, 27).

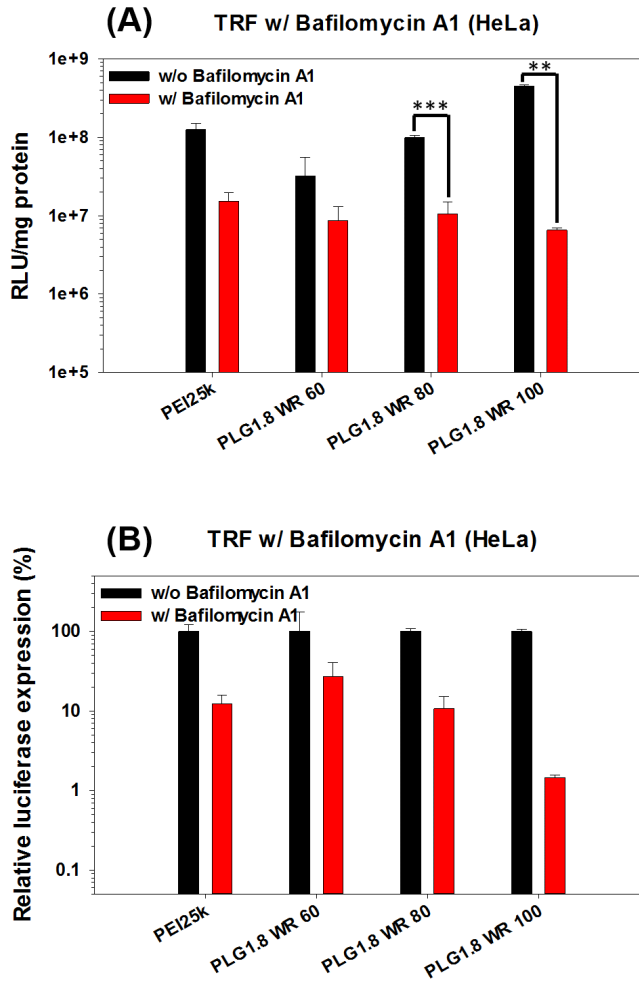


Figure 26. Transfection experiment results of PEI25k and PLG1.8 polyplexes with or without bafilomycin A1 in HeLa cells. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)

(A) RLU/mg protein, (B) Relative luciferase expression (%)

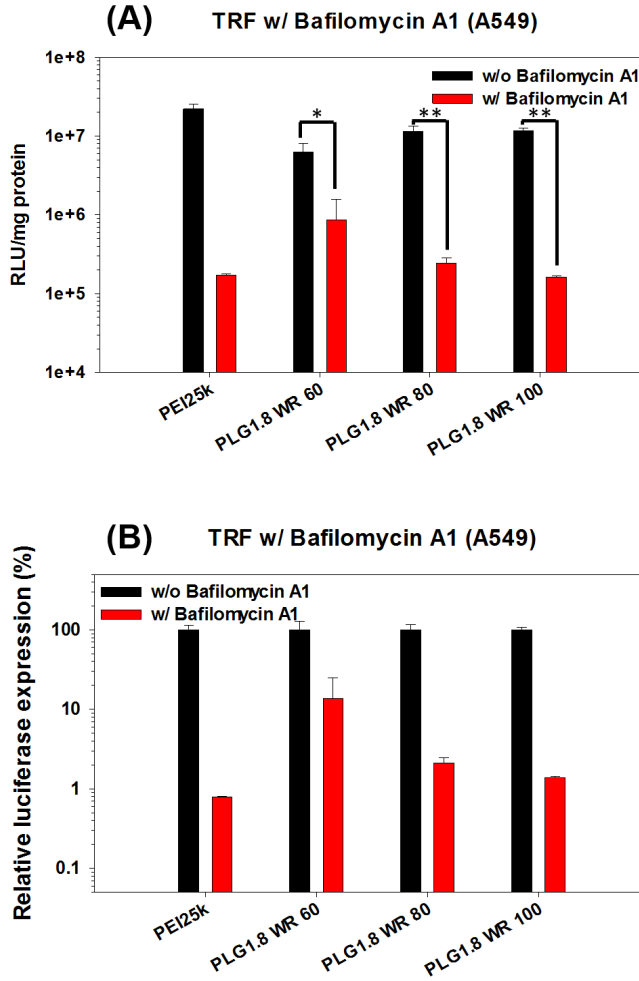


Figure 27. Transfection experiment results of PEI25k and PLG1.8 polyplexes with or without bafilomycin A1 in A549 cells. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01)

(A) RLU/mg protein, (B) Relative luciferase expression (%)

실험 결과에서 볼 수 있듯이 PLG1.8은 PEI25k와 유사하게 bafilomycin A1을 처리한 후 transfection 효율이 감소하는 모습을 보였다. Bafilomycin A1을 처리하지 않은 값을 100%로 보정한 결과를 보면 글루탐산의 양이 증가할수록 transfection 값이 더 확실하게 감소하는 모습을 확인할 수 있었다. PEI25k는 2차, 3차 아민을 갖고 있어 엔도솜 탈출 시 양성자 스폰지 효과 (Proton sponge effect)에 의해 탈출할 수 있다고 알려져 있다 [51]. 반면 유전자 전달에 사용되는 양이온성 고분자 중 하나인 poly(L-lysine)의 경우 1차 아민만 존재하기 때문에 양성자 스폰지 효과에 의해 엔도솜 탈출이 이루어지지 않고 bafilomycin A1 처리 후에도 transfection 효율이 크게 감소하지 않는다고 알려져 있다 [28]. PLG 고분자는 PEI를 개시제로 사용하였지만 분자량이 1,800에 불과하고 따라서 양성자 스폰지 효과를 보일 수 있는 2차, 3차 아민기가 분자량 25,000의 PEI25k보다 상대적으로 훨씬 적을 수 밖에 없다. 그런데 bafilomycin A1 처리 후 PLG1.8이 PEI25k와 같이 transfection 효율이 크게 감소하였다는 점은 PLG1.8도 엔도솜 탈출 시 양성자 펌프의 영향을 받는다는 것을 의미하며, 이는 PLG 고분자의 글루탐산이 엔도솜 탈출 시 PEI25k의 2차, 3차 아민과 유사한 거동을 보인다는 것을 의미한다.

#### 4.2.3 pH와 혈청 단백질 유무에 따른 PLG 폴리플렉스의 세포 투과율 평가

FACS를 이용하여 HeLa와 A549 세포에서의 PLG1.8의 세포 투과율을 확인하였다 (Figure 28-31, Table 3, 4). PEI25k의 HeLa 세포에서의 세포 투과율은 pH가 감소함에 따라 혈청 단백질이 없는 조

건에서 10.1%가 감소하였고, 혈청 단백질이 있는 조건에서 30.7%가 감소하였다. 반면 PLG1.8의 경우 혈청 단백질이 없는 조건에서 56.4%, 혈청 단백질이 있는 조건에서 16.9%로 세포 투과율이 증가하였다. 이는 앞선 transfection 실험과 연관성 있는 결과가 나타났다고 볼 수 있다. A549 세포에서도 동일한 실험을 수행하였고 그 결과는 HeLa 세포에서의 결과와 유사한 경향성을 나타내었다 (Figure 30, Table 4). PEI25k는 A549 세포에서도 pH가 감소함에 따라 혈청 단백질이 없는 조건에서 19.9%, 혈청 단백질이 있는 조건에서 40.8%가 감소하였다. PLG1.8은 반대로 각각 14.2%, 1.6% 증가하였다.

FACS 결과를 기반으로 세포 내로 투과된 유전자들의 평균 형광 강도를 확인하였다 (Figure 29, 31). PEI25k의 경우 혈청 단백질 유무에 관계없이 산성 조건에서 유전자의 세포내 투과 정도가 감소하였음을 확인할 수 있는 반면 PLG1.8 고분자를 이용한 폴리플렉스는 혈청 단백질, A549 조건에서 투과도가 소폭 감소하였고, 그 외의 모든 산성 조건에서 PEI25k와 다르게 세포내 투과도가 증가하여 더 높은 형광 값을 나타내었다. 위의 결과에서 확인하였듯 PEI25k 폴리플렉스는 산성 조건에서 더 낮은 세포 투과율을 나타내었다. 일반적으로 종양 조직 주변의 약산성 조건에서 체내 다중약물 수송체 (multidrug transporter)인 p-glycoprotein (pGp)의 활성이 증가한다는 보고가 있다 [115, 116]. 따라서 산성 조건에서 PEI25k 폴리플렉스는 세포 외로 유출되는 반면 PLG1.8 폴리플렉스는 산성 조건에서 전하 전환성질을 나타내며 양이온성이 증가하고 세포 표면 접근성이 좋아져 세포 내 투과율이 상승하였다.

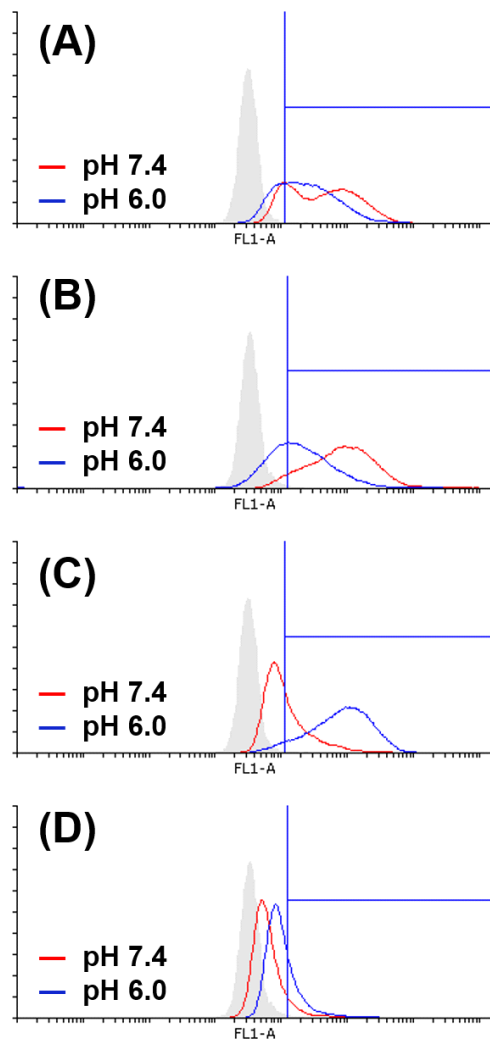


Figure 28. Flow cytometry results of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in HeLa cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

Table 3. Cellular uptake percentage of PLG1.8/YOYO-1 labeled pDNA polyplexes in HeLa cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates.

	pH 7.4	pH 6.0	
PEI25k w/o serum	82.1%	72.0%	▼ 10.1%
PEI25k w/ serum	94.2%	63.5%	▼ 30.7%
PLG1.8 w/o serum	37.8%	94.2%	▲ 56.4%
PLG1.8 w/ serum	10.3%	27.2%	▲ 16.9%



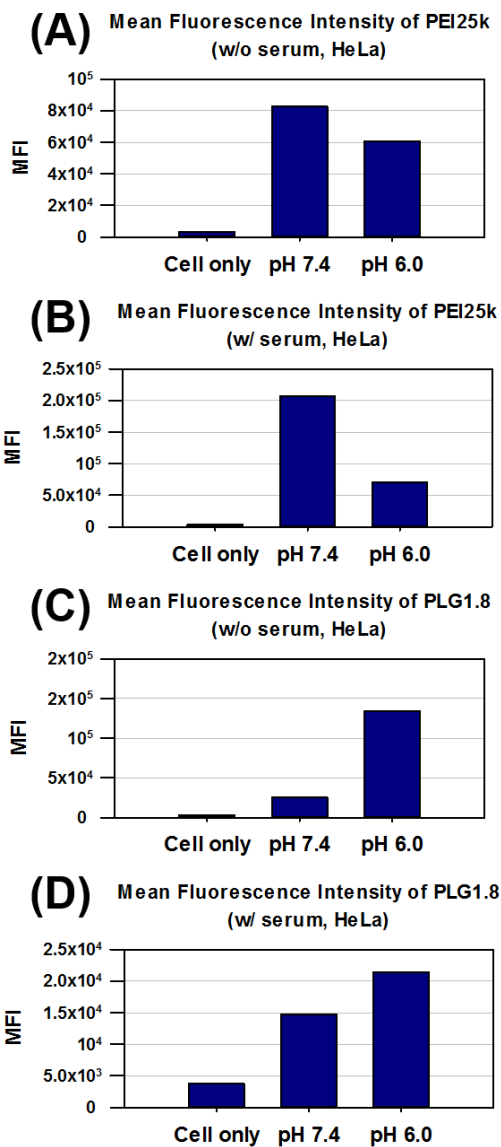


Figure 29. Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in HeLa cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D).

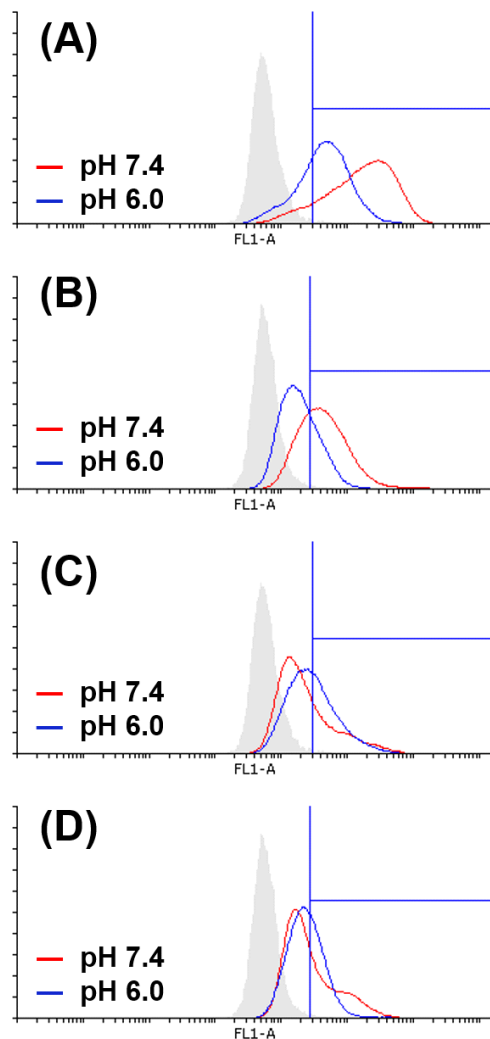


Figure 30. Flow cytometry results of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in A549 cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

Table 4. Cellular uptake percentage of PLG1.8/YOYO-1 labeled pDNA polyplexes in A549 cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates.

	pH 7.4	pH 6.0	
PEI25k w/o serum	89.5%	69.6%	▼ 19.9%
PEI25k w/ serum	69.5%	28.7%	▼ 40.8%
PLG1.8 w/o serum	31.2%	45.4%	▲ 14.2%
PLG1.8 w/ serum	38.8%	40.4%	▲ 1.6%

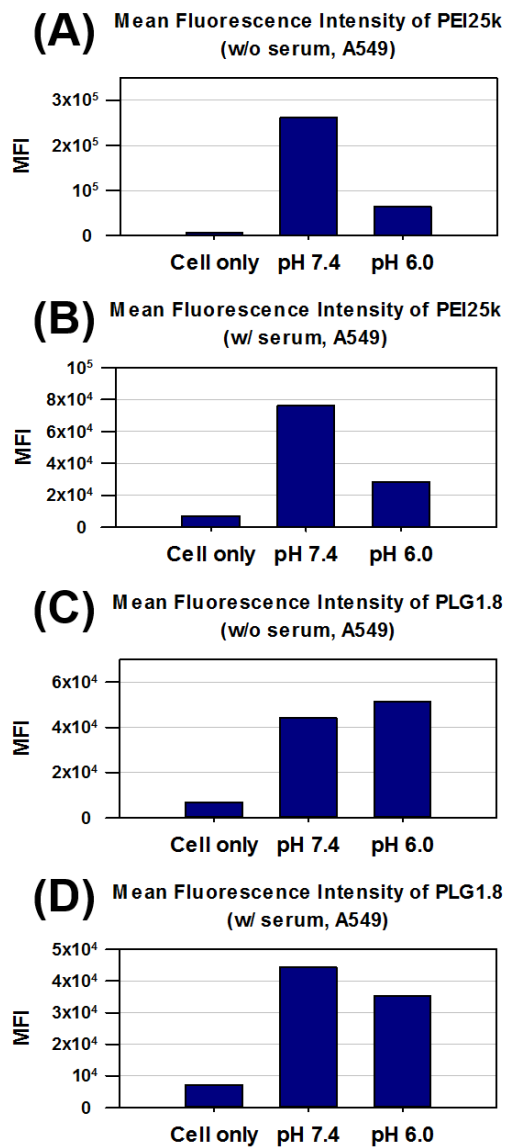


Figure 31. Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI25k with weight ratio of 1 and (C, D) PLG1.8 polymers with weight ratio of 80 in A549 cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D).

#### 4.2.4 치료용 유전자를 이용한 PLG 폴리플렉스의 암세포 사멸 효과 평가

대표적인 치료용 유전자인 pJDK-apoptin과 Bcl-2 siRNA를 이용하여 HeLa 세포에서 PLG1.8의 암세포 사멸 효과를 평가하였다 (Figure 32, 33). 먼저 pJDK-apoptin을 이용한 실험 역시 앞선 luciferase를 이용한 transfection 실험과 마찬가지로 혈청 단백질이 존재하는 약산성의 조건에서 PLG1.8의 apoptin 발현에 의한 세포 대사 활성 감소 효과가 잘 나타났다. 혈청 단백질이 없는 조건에서는 PEI25k와 PLG1.8 모두 pH에 따른 상대적 세포 생존율의 차이가 나타나지 않았다. PEI25k는 pH 7.4에서 87.9%, pH 6.0에서 83.5%, PLG1.8은 무게비 60, 80, 100 폴리플렉스에서 각각 pH 7.4에서 79.9%, 76.5%, 68.8%, pH 6.0에서 각각 73.3%, 77.1%, 67.4%를 나타냈다. 반면 혈청 단백질이 있는 조건에서 PLG1.8은 pH에 대한 효과가 더 극적으로 나타났다. PLG1.8은 pH 7.4에서의 상대적 세포 생존율이 무게비 60, 80, 100 폴리플렉스에서 각각 90.5%, 91.6%, 91.1%인데 반해 pH 6.0에서는 각각 78.4%, 65.0%, 54.4%를 나타내었다.

Bcl-2 siRNA를 이용한 실험도 진행하였다. RNA interference는 21~25개의 짧은 서열의 뉴클레오티드를 갖는 RNA가 생체 내에서 단백질 발현을 억제하는 매우 강력한 기작이다 [117-120]. 대조군으로 사용된 PEI25k의 경우 혈청 단백질이 없는 pH 7.4 배지에서 78.1%의 세포 생존율을 보였지만 pH 6.0에서는 90.8%로 증가하였다. 반면 PLG1.8의 경우 pH 7.4와 비교하여 pH 6.0에서 모두 세포 대사 활성 감소 효과가 향상되었다. 그리고 혈청 단백질 조건에서는 PEI25k의 경우 Bcl-2 siRNA 효과가 거의 발현되지 않은 반면 PLG1.8은 무게비 100의 pH 7.4에서 세포 생존율은 85.7%로 pH 6.0

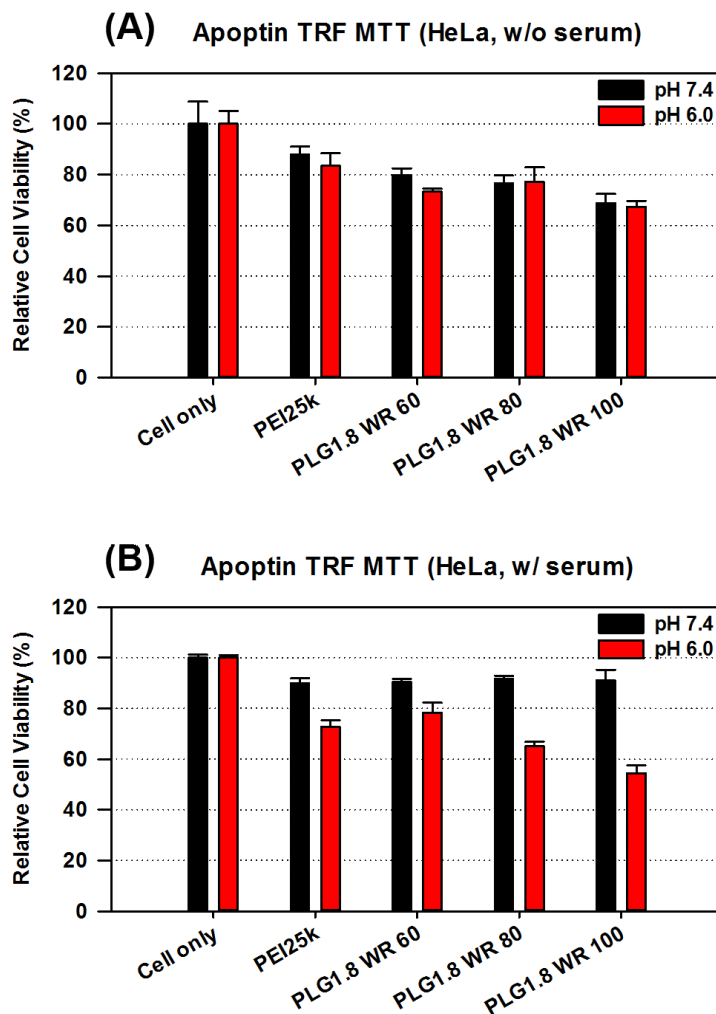


Figure 32. Anticancer activity evaluation by MTT assay with apoptin transfection experiment of PEI25k and PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1.

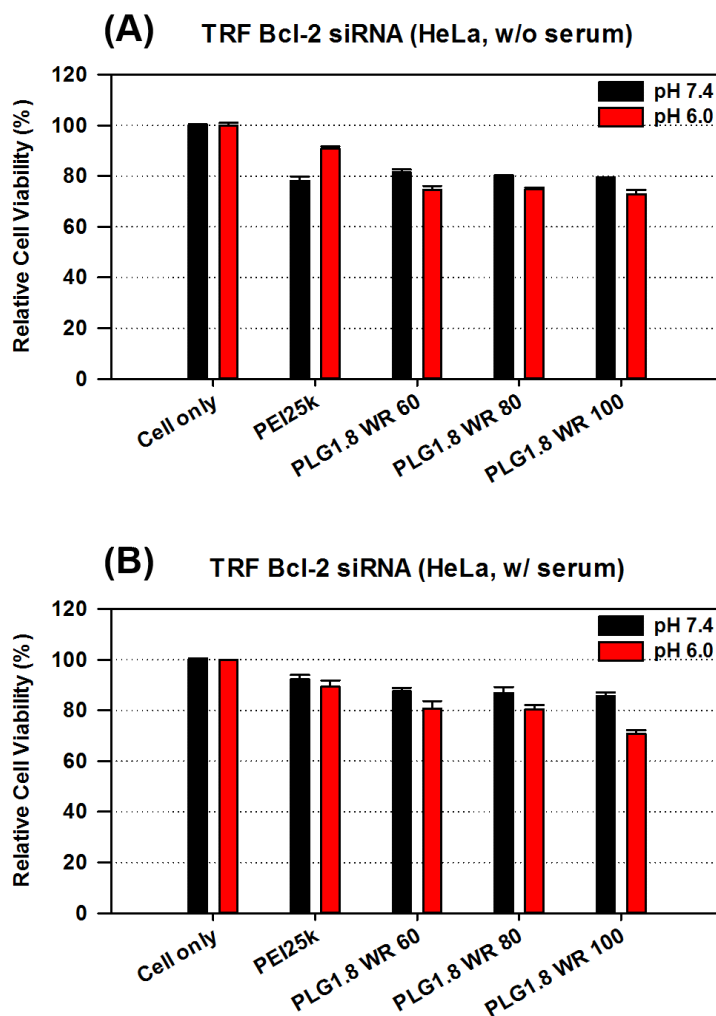


Figure 33. Anticancer activity evaluation by MTT assay with Bcl-2 siRNA transfection experiment of PEI25k and PLG1.8 polyplexes in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. The weight ratio of PEI25k polyplexes was 1.

에서는 70.7%로 더욱 향상된 세포의 활성 감소 효과가 나타났다.

4.2에서는 전하 전환성 고분자인 PLG를 이용하여 유전자 전달체로 응용한 연구를 진행하였다. PEI25k를 포함한 비바이러스성 유전자 전달체의 가장 큰 단점 중의 하나는 transfection 효율이 낮다는 점이다. 이를 극복하기 위하여 혈청 조건에서 저항성을 갖고 종양 조직 환경에서 구조 변화를 통해 유전자 전달 효율을 높이려고 하였다. 분지형 저분자량의 PEI를 개시제로 하여 양이온성 아미노산인 라이신과 음이온성 아미노산인 글루탐산을 중합하여 폴리펩타이드 구조의 전달체를 합성하였고, 라이신과 글루탐산의 비율에 따라 PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7 세 종류의 PLG 고분자를 이용하여 실험을 진행하였다. PLG2.7을 제외한 PLG 고분자는 유전자와 정전기적 인력을 통해 유전자가 고분자 내부에 안정적으로 위치한 폴리플렉스를 형성하였고, 이 폴리플렉스는 산성 조건에서 음이온-양이온간 표면 전하의 전하 전환성질을 나타내었다. Transfection 실험 결과 PLG1.8의 유전자 전달 효과가 가장 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. PLG1.5는 음이온/양이온 비율이 0.91로 양이온성에 가까운 고분자이며, PLG1.8은 음이온/양이온 비율이 1.13으로 음이온성에 상대적으로 더 가깝다. PLG1.8을 이용하여 혈청 단백질이 있는 약산성 조건에서 리포터 유전자인 pCN-Luci, 치료용 유전자인 pJDK-apoptin, Bcl-2 siRNA의 transfection 효율을 PEI25k 대비 크게 증가시켰다. 특히 Bafilomycin A1을 사용한 transfection 실험에서 PLG1.8 고분자는 글루탐산의 비율이 증가함에 따라 transfection 효율이 감소하는 특징을 볼 수 있었다. 이는 글루탐산이 PEI의 2, 3차 아민처럼 transfection 과정에서 양성자 펌프에 관여하고 있음을 의미하였다. 결과적으로 본 연구를 통해 음이온/양이온 비율이 1.13



으로 생체 pH에서 음이온성을 띄며 혈청 단백질에 대한 저항성 및 안정성을 가지면서 pH에 따라 전하 전환성의 성질을 나타내 약산성에서 유전자에 의한 단백질 발현율이 증가하는 PLG1.8이 PLG 고분자 유전자 전달체 중 가장 좋은 효율을 나타내는 고분자로 볼 수 있었다.

### 4.3 PLG를 코팅한 PEI 개질 산화 그래핀 (PEI-rGO) 약물 전달 시스템

#### 4.3.1 PEI-rGO의 DOX 담지 및 함량 확인

산화 그래핀 (Graphene oxide, GO)은 소수성 약물 담지에 유리한 구조를 갖고 있으며, 제조 과정에서 형성되는 다양한 관능기를 개질하여 이를 약물 전달체에 응용하는 연구는 많이 보고되었다. 본 연구에서 사용된 PEI-rGO는 1 mg의 PEI-rGO 당 0.62 mg의 PEI (분자량 1,800)를 함유하고 있다.

독소루비신은 대표적인 항암제 중의 하나로 다음의 두 경로를 통해 항암 작용이 나타난다. 먼저 DNA 사이에 끼어 들어가며 topoisomerase-II-mediated DNA repair를 방해함으로써 독성을 나타내는 것과 자유 라디칼을 형성하여 세포막, DNA 등에 독성을 나타내는 것이다. DOX는 매우 좋은 효과를 가진 항암제이지만 심장 독성 (Cardiotoxicity)이 대표적인 부작용으로 알려져 있어 부작용을 줄이고 치료 효과를 높이기 위해서 치료 부위에 효과적으로 전달할 수 있는 약물 전달 시스템이 매우 중요하다고 볼 수 있다 [121].

PEI-rGO에 DOX를 담지하고 흡광도 및 형광 측정을 통해 담지 여부 및 담지 효율을 계산하였다 (Figure 34). DOX는 500 nm에서 흡광도 peak이 나타나고 형광의 경우 excitation 480 nm에서 emission 스펙트럼 파장을 통해 존재 여부를 확인할 수 있다. 흡광도 스펙트럼에서 DOX는 500 nm에서 관찰되면서 PEI-rGO에 담지되었음을 확인하였고, 형광 스펙트럼을 통해 90% DMSO 용매에서 담지된 DOX가 PEI-rGO로부터 분리되어 형광이 관찰되었다. 위의 스펙트럼 값으로 계산한 DOX의 담지 효율은 82.0%였다.

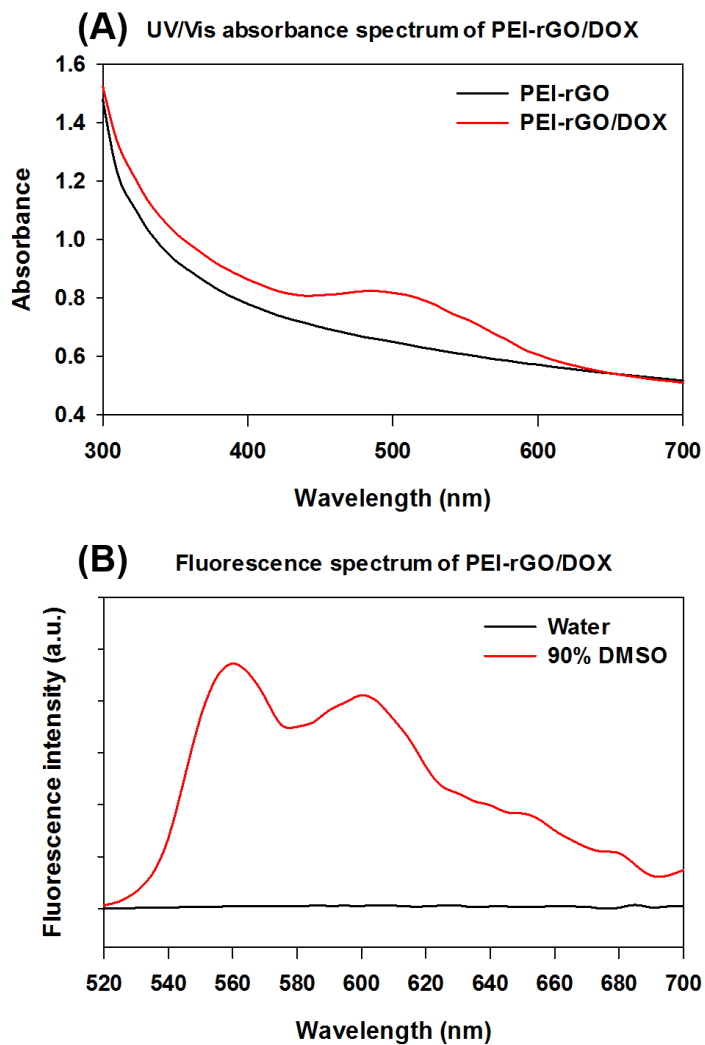


Figure 34. (A) Absorbance spectrum of PEI-rGO (black line) and PEI-rGO/DOX (red line). (B) Fluorescence spectrum of PEI-rGO/DOX in water (black line) and 90% DMSO (red line).

#### 4.3.2 PLG를 이용한 PEI-rGO의 코팅 및 PLG를 코팅한 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 특성 분석

pH 감응성을 갖는 전하 전환성 고분자인 PLG를 이용하여 PEI-rGO 코팅 및 pH에 따른 PLG 코팅 PEI-rGO, PEI-rGO/DOX의 특성 분석을 진행하였다. 먼저 코팅을 위한 고분자와 PEI-rGO 사이의 적절한 비율 확인을 위해 PEI-rGO 무게 대비 10, 20, 30, 50 배에 해당하는 PLG1.0, 1.5, 1.8, 2.7을 이용하여 코팅을 진행하고 DLS를 이용하여 코팅한 PEI-rGO 입자의 크기 및 표면 전하 측정을 진행하였다 (Figure 35). 모든 실험은 pH 조절을 하지 않은 3차 증류수에서 진행하였다 (pH 6.8).

먼저 PLG1.0으로 코팅한 PEI-rGO의 크기는 무게비 10부터 30까지 증가하다가 무게비 50에서 감소하였다. 그리고 표면 전하의 경우 무게비 10에서 제일 높다가 무게비 50으로 갈수록 감소하였다. 무게비 10에서는 기존 PEI-rGO의 크기 및 표면 전하와 큰 차이가 없어 실제로는 무게비 20부터 코팅이 진행된다고 볼 수 있다. 기존의 PEI-rGO는 약 200 nm의 크기와 +50 mV의 표면 전하를 갖고 있다. 따라서 표면 전하는 PLG1.0이 증가함에 따라 표면에 코팅된 PLG가 PEI-rGO의 높은 표면 전하를 차폐하며 제타 전위 값이 감소하였다. 무게비 20과 30을 보면 코팅이 진행되면서 입자의 크기가 크게 증가하는 것을 볼 수 있는데 이는 코팅이 진행되는 PEI-rGO 입자에 아직 코팅이 진행되지 않은 PEI-rGO 입자가 PLG를 매개로 하여 PEI-rGO끼리 응집되는 현상으로 예측할 수 있다 [122].

PLG1.5의 경우 무게비 10부터 30까지는 입자의 크기가 비교적 안정적으로 유지되다가 무게비 50에서 크게 입자의 크기가 증가하는 것을 볼 수 있다. PLG1.5는 0.91의 적절한 음이온/양이온 비율을 갖고

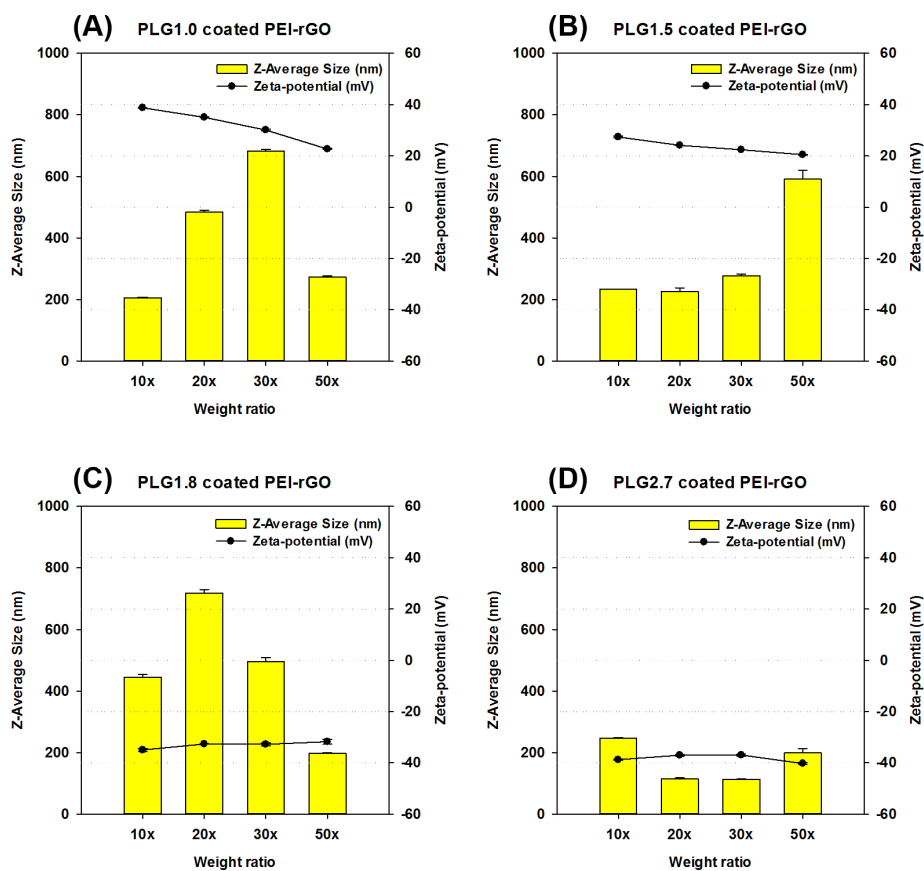


Figure 35. Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7 coated PEI-rGO with various weight ratio (10, 20, 30, 50).

있으며 따라서 PLG1.0에 비해 PLG1.5는 적절한 무게비를 유지하고 있을 때 코팅이 잘 이루어졌다. PLG1.0과 마찬가지로 입자의 표면 전하는 무게비가 증가함에 따라 점차 감소하였다. 다만 PLG1.5의 경우 PLG1.0과는 다르게 무게비 10에서 +23.37 mV로 기존 PEI-rGO에 비해 제타 전위 값이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 무게비 10에서도 코팅이 이루어졌음을 의미한다.

PLG1.8의 경우 음이온/양이온 비율이 1.13으로 고분자 내 음이온 비율이 더 높다. 따라서 높은 양이온성을 갖는 PEI-rGO와 상대적으로 쉽게 코팅이 될 것이라고 예측했고, 제타 전위 값은 이를 뒷받침 하였다. 무게비 10에서 -35 mV의 제타 전위 값을 보였고, 음의 표면 전하는 높은 무게비에서도 계속해서 유사한 수준으로 유지되었다. PLG1.8은 무게비 20까지 고분자와 PEI-rGO 입자간 응집 현상이 나타나며 크기가 크게 증가하다가 무게비 30이후부터 안정되는 모습을 확인할 수 있었고 무게비 50에서는 매우 안정한 크기와 제타 전위값을 갖는 입자가 형성되었다.

PLG2.7은 합성한 PLG 고분자들 중 1.69의 가장 높은 음이온/양이온 비율을 갖고 있다. 따라서 정전기적 인력에 의해 PEI-rGO에 쉽게 코팅이 가능하고 이는 무게비 10부터 50까지 크기와 표면 전하 측면에서 가장 안정한 상태의 코팅 입자를 형성하였다.

PLG 고분자를 이용한 코팅에서 제일 중요한 것은 원하는 pH에서 원하는 전하 전환 효율을 나타내야 한다는 점이다. 가장 이상적인 형태는 일반적 생체 pH에서 음의 표면 전하를 갖다 약산성 조건에서 양전하로 전환되는 것이다. Figure 36에서는 DLS를 이용하여 무게비 30의 PLG 고분자로 코팅한 PEI-rGO 입자들의 pH에 따른 전하 전환성을 확인하였다.

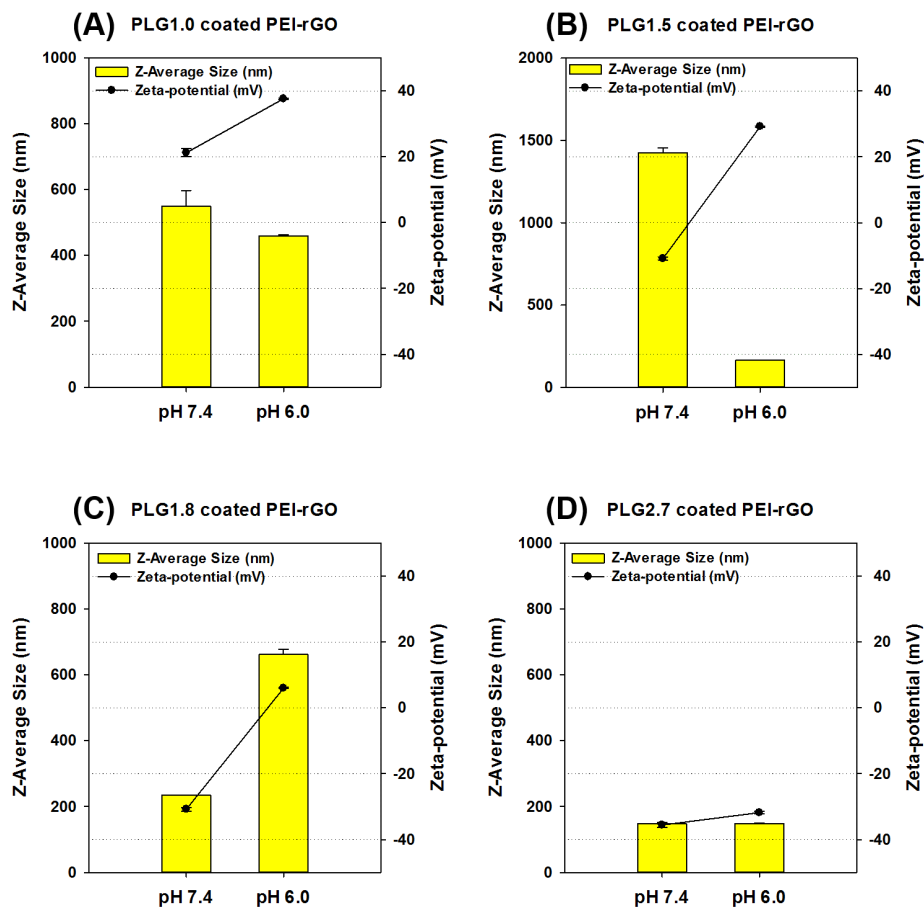


Figure 36. Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.0, (B) PLG1.5, (C) PLG1.8 and (D) PLG2.7 coated PEI-rGO with pH 7.4 and 6.0. The weight ratio between PLG polymers and PEI-rGO was set to 30.

PLG1.0을 코팅한 PEI-rGO 입자는 pH 7.4에서 548.7 nm의 크기와 +21.2 mV의 표면 전하를 가지다 pH 6.0에서 459 nm로 크기가 소폭 감소하며 +37.6 mV로 표면 전하 역시 조금 증가하는 것을 확인하였다. PLG1.0은 표면 전하가 약산성 조건에서 소폭 증가하긴 하였지만 양에서 양의 방향으로 이동하였기에 PEI-rGO 코팅 시 뛰어난 전하 전환성을 갖지는 못하였다. PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO 입자는 pH 7.4에서 각각 1425 nm, -10.87 mV의 크기 및 표면 전하를 가지다가 pH 6.0에서 164.3 nm, +29.2 mV의 크기 및 표면 전하를 나타냈다. PLG1.8을 코팅한 PEI-rGO 입자는 생체 pH 조건에서 235.2 nm, -30.8 mV, 그리고 약산성 조건에서 661.6 nm, +5.99 mV 값을 나타냈다. 전하 전환성을 나타내었지만 PLG1.8의 경우에는 실제 종양 조직에서 작동해야 하는 pH인 6.0에서 입자의 크기가 아직 크고 표면 전하 값도 충분히 크지 않아 세포 막에 쉽게 접근이 어려울 것으로 예측하였다. PLG2.7은 PLG1.0과 마찬가지로 코팅한 PEI-rGO 입자의 pH에 따른 차이를 확인하기 어려웠다. PLG2.7 역시 PEI-rGO 코팅 시에 전하 전환성 효과를 관찰하기 어려웠다.

실제 코팅한 입자의 암세포 사멸 효과를 살펴보기에 앞서 DOX를 담지한 PEI-rGO도 동일한 효과를 보이는지 확인하기 위해 PEI-rGO에 DOX를 담지한 입자에 PLG1.5와 PLG1.8로 코팅하고 pH에 따른 크기와 표면 전하를 확인하였다 (Figure 37). PLG 고분자로 코팅한 PEI-rGO/DOX는 PEI-rGO를 코팅한 입자와 유사한 DLS 결과를 보여주었다. 위의 실험 결과들을 바탕으로 PLG 고분자로 코팅한 PEI-rGO/DOX의 pH에 따른 거동을 도식으로 나타내었다 (Figure 38).



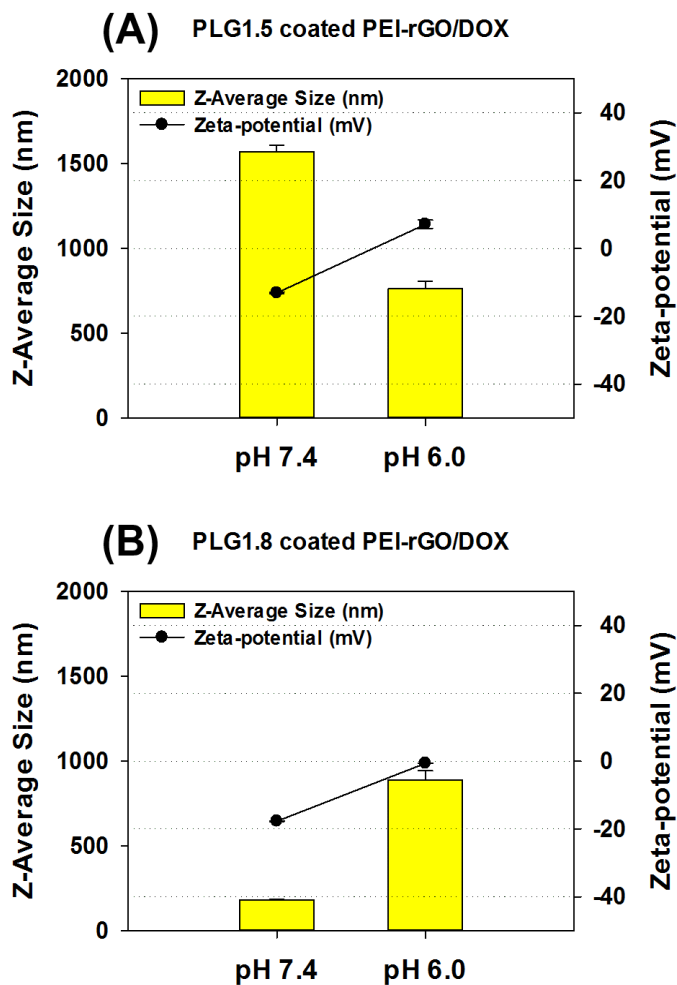


Figure 37. Z-Average sizes and zeta-potentials of (A) PLG1.5 and (B) PLG1.8 coated PEI-rGO/DOX with pH 7.4 and 6.0. The weight ratio between PLG polymers and PEI-rGO/DOX was set to 30.

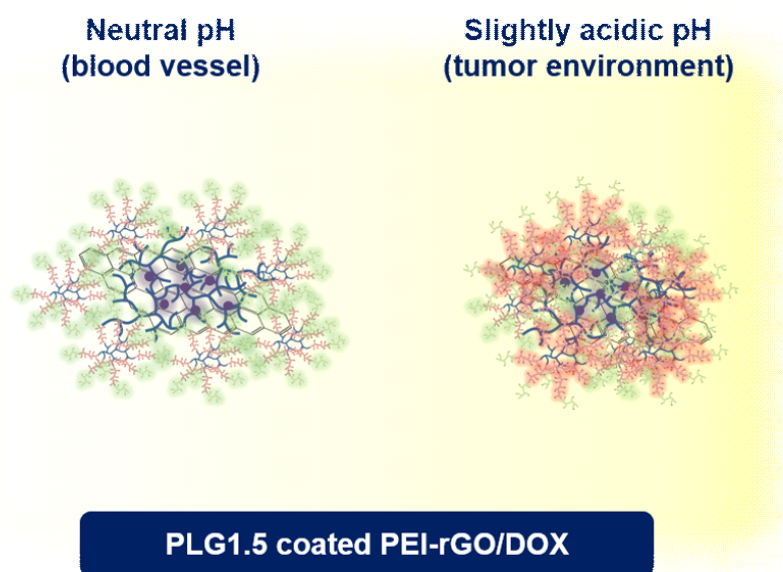


Figure 38. Schematics of PLG1.5 coated PEI-rGO at neutral and slightly acidic pH conditions.

PLG로 코팅한 PEI-rGO의 형태학적 관찰을 위해 에너지 투과 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다 (Figure 39). PEI-rGO와 PEI-rGO/DOX는 표면이 날카로운 형태의 판상 구조 입자가 관찰되었다. 각각의 산화 그래핀에 고분자가 코팅되면 비교적 구형의 입자가 관찰되며 코팅된 PEI-rGO 표면에는 고분자 특유의 흐릿한 가장자리 모습이 관찰되었다. 이는 산화 그래핀이나 탄소 나노 튜브 등의 탄소 동소체를 고분자로 코팅하는 경우 나타나는 일반적인 현상으로 PEI-rGO와 PEI-rGO/DOX에 PLG가 성공적으로 코팅이 되었음을 확인하는 결과이다 [123, 124]. EFTEM을 이용하여 확인한 입자의 크기는 대략 300-400 nm의 크기를 갖는 입자로 이는 DLS를 통해 확인한 입자의 크기와 유사하다고 볼 수 있다.

다음은 PLG1.5 코팅 PEI-rGO 입자의 혈청 단백질에 대한 안정성을 확인하였다. 일반적인 약물 및 유전자 전달에 있어서 혈장의 단백질은 매우 중요한 장애물 중 하나이다. PLG 고분자는 전하 전환성을 갖고 있기 때문에 PLG로 코팅한 입자는 일반적인 생체 pH에서 음이온성의 혈장 단백질과의 정전기적 인력에 의한 상호작용으로부터 보호받을 수 있다. Figure 40 에서 볼 수 있듯이 PEI-rGO와 PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO의 경우 초반 4시간까지 입자의 크기가 급격하게 증가하였다. 그러나 PLG1.5를 코팅한 입자의 경우 초반 4시간까지 입자의 크기가 400 nm 전후로 유지되며 24시간까지 지속되는 반면, PLG를 코팅하지 않은 PEI-rGO는 초반 4시간 이후 입자의 크기가 550 nm 전후로 상대적으로 급격하게 증가하며 이 차이를 계속해서 유지하였다. 또한 pH 6.0의 산성 조건에서는 pH 7.4 에서보다 양이온성이 증진되고 혈청 단백질과의 정전기적 상호작용이 증가하면서 입자의 크기가 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 산성

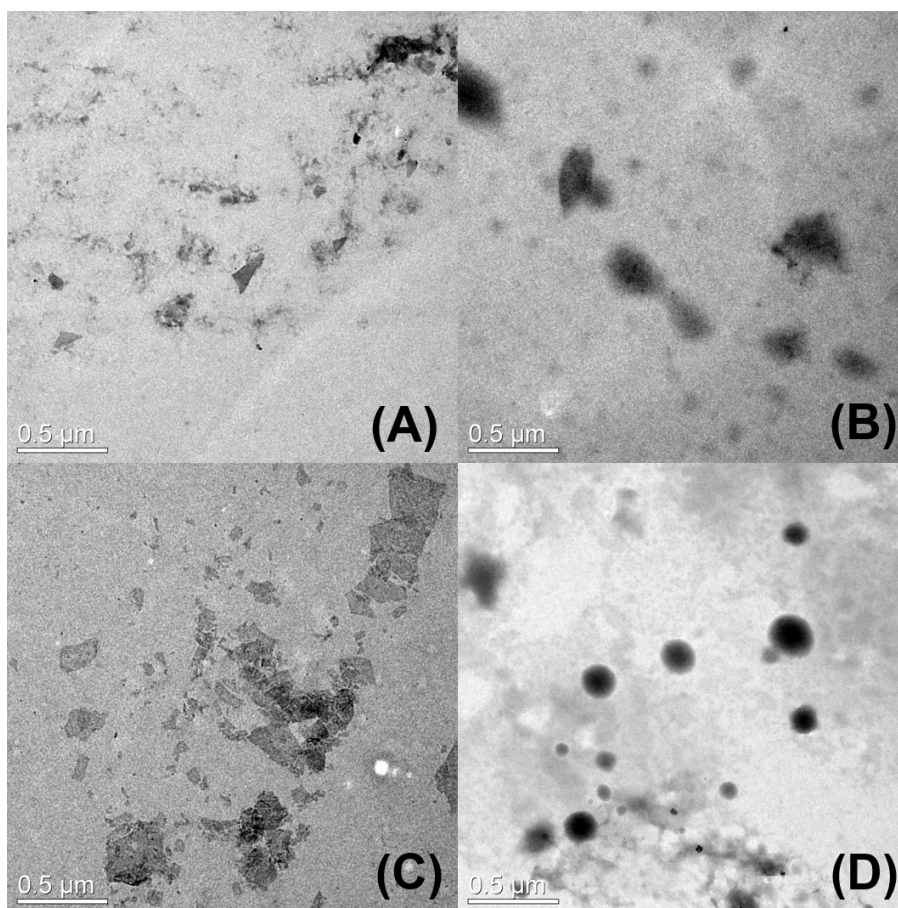


Figure 39. EFTEM images of (A) PEI-rGO, (B) PLG1.5 coated PEI-rGO, (C) PEI-rGO/DOX, (D) PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX. (Scale bar = 0.5 μm)

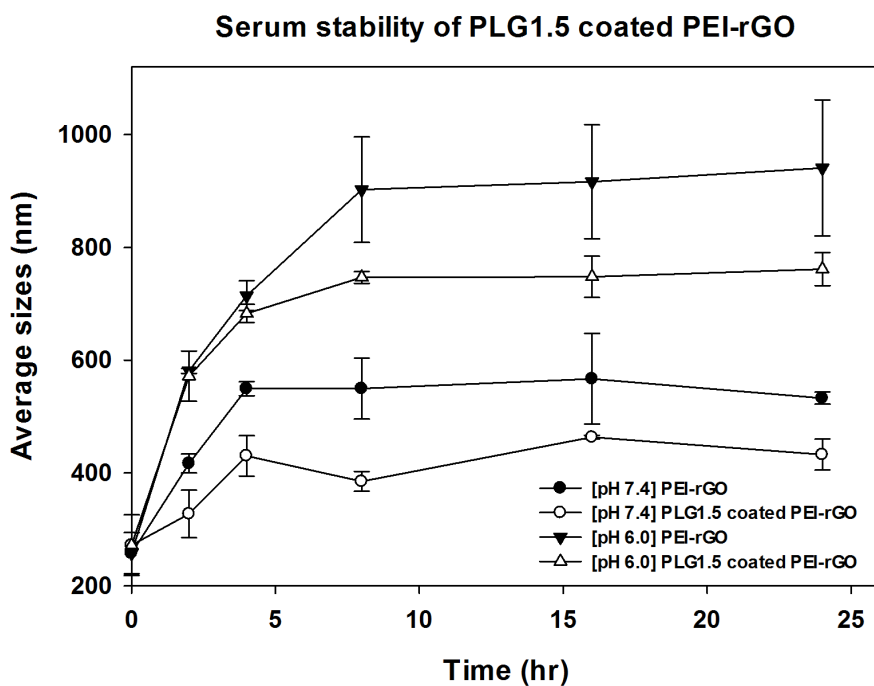


Figure 40. Serum stability experiment results of PEI-rGO and PLG1.5 coated PEI-rGO by using DLS.

조건에서도 마찬가지로 PLG1.5 코팅이 혈청 단백질과의 상호작용을 방지하는 역할을 나타내었다. 결국 PLG 고분자 코팅이 PEI-rGO 입자를 혈장 단백질로부터 보호할 수 있다는 점을 보여준다.

PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 약물 방출 거동을 확인하였다 (Figure 41) PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 약물 방출은 pH 7.4, pH 5.0, 5 mM의 glutathione (GSH)를 포함한 pH 5.0 조건에서 진행하였다. 초기 1시간에서의 약물 방출량은 각각 12.3%, 16.8%, 18.7%, 2시간에서의 약물 방출량은 각각 15.6%, 21.2%, 23.5%, 8시간에서의 방출량은 23.3%, 27.5%, 30.9%로 약산성, GSH 조건에서 약물 방출이 증가하였다.

#### 4.3.3 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 암세포 사멸 효과 평가

PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX를 이용하여 암세포 사멸 효과를 평가하였다. 먼저 MTT 실험을 통해 HeLa, A549 세포에서 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 사멸 효과를 확인하였다. HeLa 세포에서는 혈청 단백질이 없는 조건에서 DOX 농도 10  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 90.6%에서 79.4%로 약산성에서 약간의 세포 대사 활성도의 감소가 나타났고, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 pH에 따른 효과가 미미하였다 (Figure 42). 반면에 혈청 단백질이 있는 조건에서는 DOX 농도 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 86.4%에서 70.1%로, 71.5%에서 61.0%로 세포 대사 활성이 감소하였다. A549 세포에서도 HeLa 세포주와 유사한 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 43). 혈청 단백질이 없는 조건에서 PLG 고분자로 코팅한 PEI-rGO는 DOX 농도 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 pH 조건에 따라 각각 94.0%에서 95.5%, 92.5%에서 88.8%, 83.4%에서 80.9%의 3% 내외의 차이를 확인하였다. 그러나 혈청

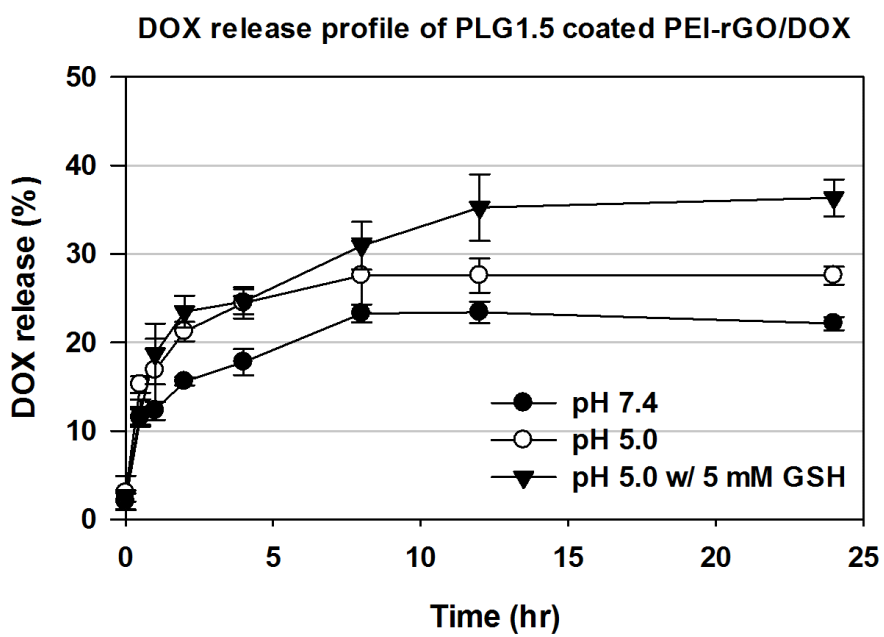


Figure 41. DOX release profile of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX.

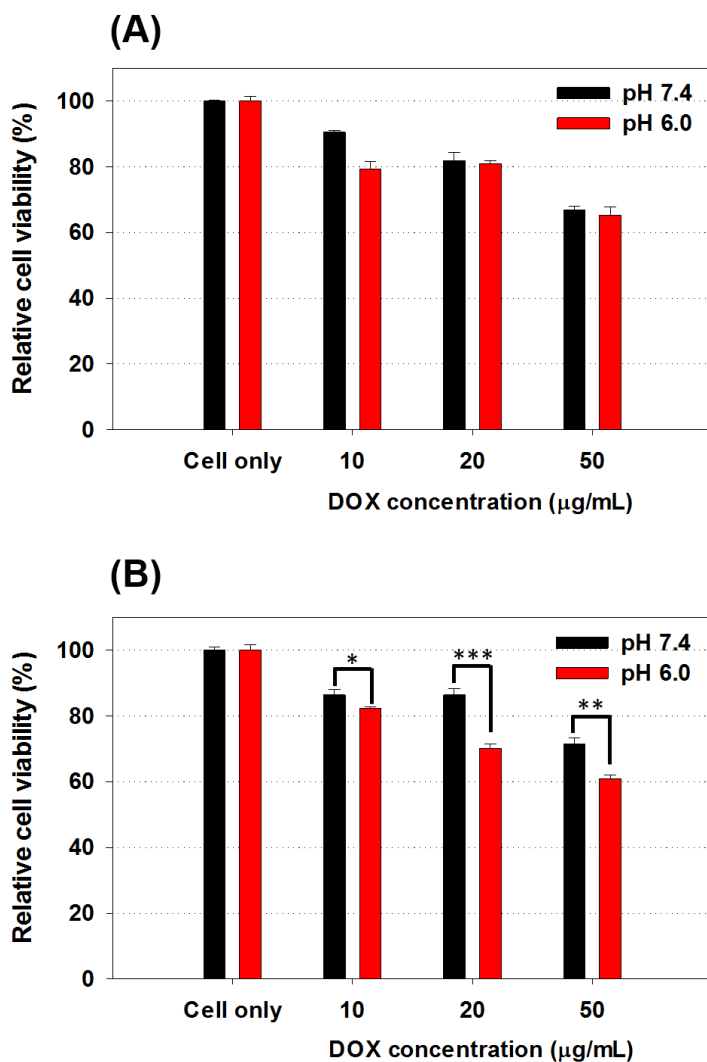


Figure 42. Anticancer activity evaluation by MTT assay of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells (A) without serum and (B) with serum. (mean $\pm$ SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)



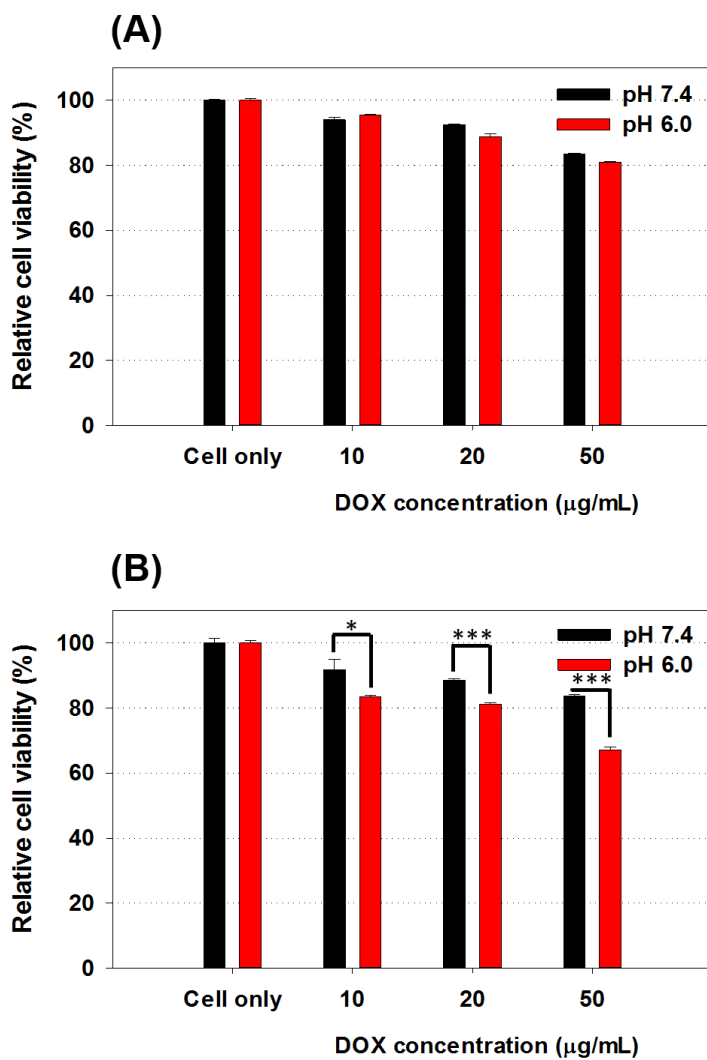


Figure 43. Anticancer activity evaluation by MTT assay of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells (A) without serum and (B) with serum. (mean±SD, n = 3, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001)

단백질이 있는 조건에서는 DOX의 농도 10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 pH 조건에 따라 각각 91.8%에서 83.5%, 88.6%에서 81.2%, 83.8%에서 67.2%의 최소 7.4%에서 최대 16.6%까지 차이가 나는 것을 확인하였다. 이는 앞서 여러 실험을 통해 확인했듯 전하 전환 성질을 갖는 PLG 고분자에 의해 혈청 단백질에 대한 저항성을 가지면서 동시에 약산성 조건에서 입자의 순전하가 양의 값으로 전환되며 세포 투과에 적합한 크기와 표면 전하를 갖게 되기 때문이다. 또한 figure 40에서 확인하였듯 산성 조건에서 양이온성의 증가로 혈청 단백질 알부민과의 상호작용 증가로 인해 세포의 투과율이 증가하여 혈청 조건에서 세포의 사멸 효과가 증진되었다 [125-127].

#### 4.3.4 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 투과율 평가

Flow cytometry를 이용하여 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO 입자의 세포 투과율을 확인해보았다. HeLa 세포주에서 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO의 FACS 결과 및 세포 투과율은 Figure 44, 45 및 Table 5에서 확인할 수 있다. 혈청 단백질이 없는 조건에서는 PEI-rGO/DOX 및 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 투과율이 모두 소폭 감소하였다. 그러나 혈청 단백질이 있는 조건에서는 PLG를 사용하지 않은 경우 pH 7.4에 비해 pH 6.0이 약 3.7% 정도 조금 상승하였지만, PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO는 7.9%에서 20.6%로 약 12.7%의 세포의 투과 효율이 증가하였다. 위의 FACS 결과를 기초로 평균 형광 강도를 통해 세포 투과율을 확인한 결과 PEI-rGO 및 PLG1.5 coated PEI-rGO는 모두 산성 조건에서 세포 투과율이 상승하는 모습을 볼 수 있었다. 이는 앞서 혈청 단백질에 대한 안정성 실험 결과에서 설명한 것과 마찬가지로 산성 조건에서 입자의

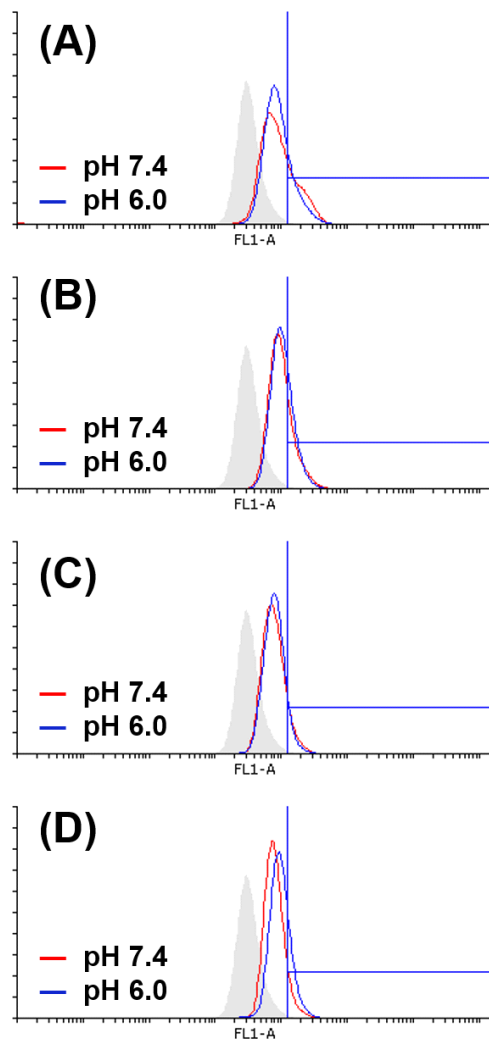
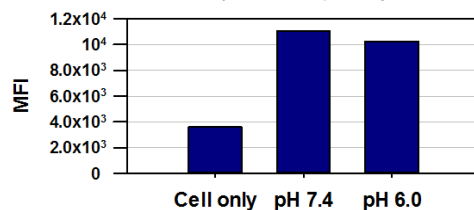


Figure 44. Flow cytometry results of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in HeLa cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

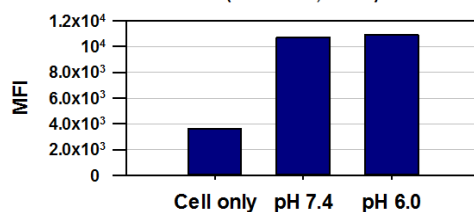
Table 5. Cellular uptake percentage of PEI-rGO/DOX and PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates.

	pH 7.4	pH 6.0	
PEI-rGO/DOX w/o serum	26.6%	21.4%	▼ 5.2%
PEI-rGO/DOX w/ serum	23.9%	27.6%	▲ 3.7%
PLG+PEI-rGO/DOX w/o serum	10.1%	8.1%	▼ 2.0%
PLG+PEI-rGO/DOX w/ serum	7.9%	20.6%	▲ 12.7%

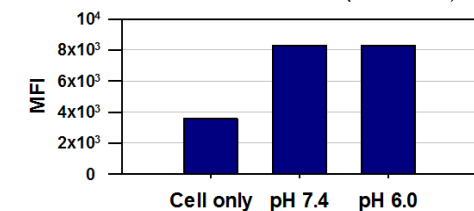
**(A)** Mean Fluorescence Intensity of PEI-rGO/DOX  
(w/o serum, HeLa)



**(B)** Mean Fluorescence Intensity of PEI-rGO/DOX  
(w/ serum, HeLa)



**(C)** Mean Fluorescence Intensity of  
PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX (w/o serum, HeLa)



**(D)** Mean Fluorescence Intensity of  
PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX (w/ serum, HeLa)

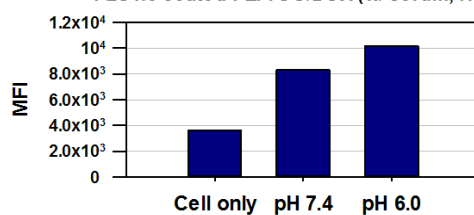


Figure 45. Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in HeLa cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D).

양이온성이 증진되고 혈청 단백질과의 상호작용 증가로 인한 세포의 알부민 수용체 영향을 받기 때문으로 해석할 수 있다.

A549에서도 HeLa와 전반적으로 유사한 결과를 나타냈다 (Figure 46, 47 Table 6). PLG를 코팅한 PEI-rGO는 혈청 단백질이 없는 조건에서는 약산성이 되자 세포 투과율이 11.1% 감소하였고 혈청 단백질이 있는 조건에서는 세포 투과율이 13.2% 증가하였다. 다만 A549에서는 PLG 코팅을 하지 않은 PEI-rGO가 혈청 단백질이 있는 약산성 조건에서 pH 7.4보다 13.5%의 세포 투과율 향상이 나타났다. 평균 형광 강도를 통해서도 유사한 결과를 얻을 수 있었고, 이는 앞서 설명한 바와 같이 혈청 단백질 함유 및 약산성 조건에서 산성화에 의한 양이온성 증가로 세포막 접근이 용이해짐과 더불어 혈청 단백질 중 알부민 수용체에 의해 상대적으로 세포 투과율이 증가하였기 때문이라고 추측할 수 있다.

#### 4.3.5 PLG를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 세포 내 거동 관찰

형광현미경을 이용하여 PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO 입자의 HeLa 세포 및 A549 세포 내 거동을 확인하였다 (Figure 48, Figure 49). HeLa와 A549 세포에서 모두 PEI-rGO/DOX의 세포 내 투과가 잘 이루어졌고 주로 세포질에 DOX가 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 일부 세포들은 merged 사진에서 DOX가 핵에 위치하며 보랏빛으로 나타나기도 하였다.

위 연구에서는 PLG를 이용하여 PEI-rGO/DOX를 코팅하고 이를 약물 전달체로 응용하였다. 총 4가지의 PLG 고분자 중 암 치료 적용에 가장 효율적인 pH에 대한 전하 전환성이 나타나는 PLG 및 무게비로 무게비 30의 PLG1.5를 선택하였고 이를 이용하여 이후의 실험을

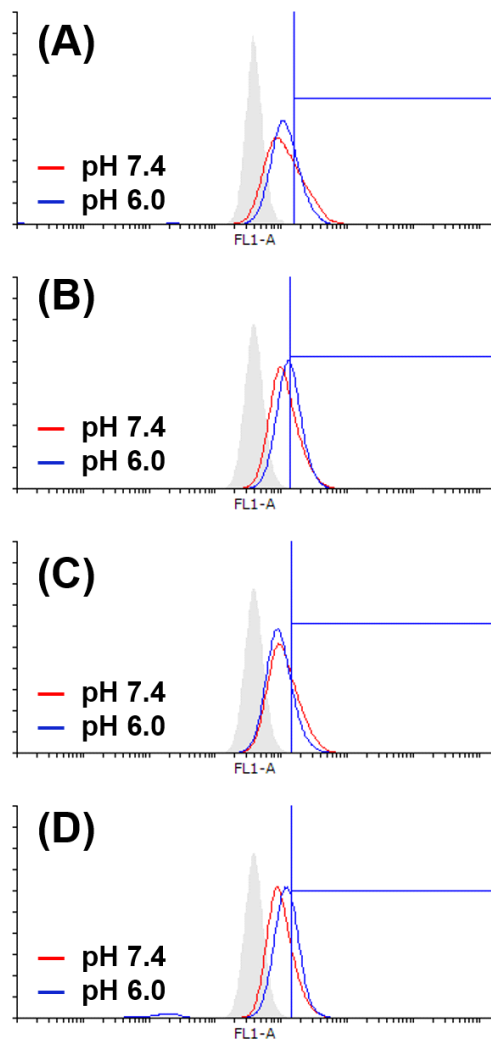


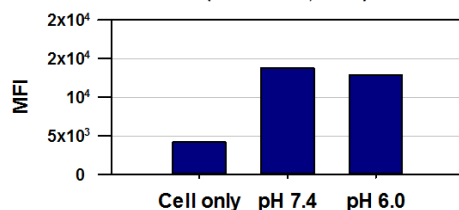
Figure 46. Flow cytometry results of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in A549 cells. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D). The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

Table 6. Cellular uptake percentage of PEI-rGO/DOX and PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells. % values are estimated efficiencies for cellular uptake of polyplexes by setting divided regions as gates.

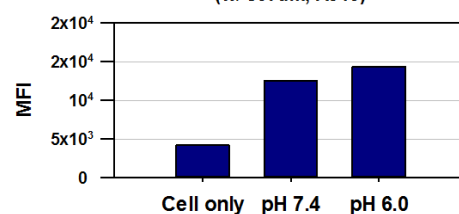
	pH 7.4	pH 6.0	
PEI-rGO/DOX w/o serum	32.3%	30.0%	▼ 2.3%
PEI-rGO/DOX w/ serum	27.1%	40.6%	▲ 13.5%
PLG+PEI-rGO/DOX w/o serum	27.8%	16.7%	▼ 11.1%
PLG+PEI-rGO/DOX w/ serum	18.6%	31.8%	▲ 13.2%



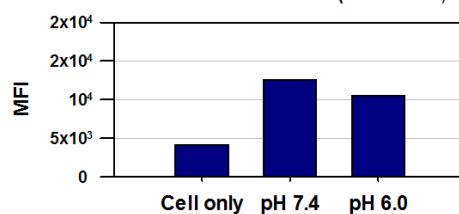
**(A)** Mean Fluorescence Intensity of PEI-rGO/DOX  
(w/o serum, A549)



**(B)** Mean Fluorescence Intensity of PEI-rGO/DOX  
(w/ serum, A549)



**(C)** Mean Fluorescence Intensity of  
PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX (w/o serum, A549)



**(D)** Mean Fluorescence Intensity of  
PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX (w/ serum, A549)

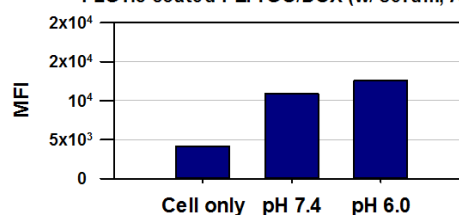


Figure 47. Mean fluorescence intensity of (A, B) PEI-rGO/DOX and (C, D) PLG1.5 coated PEI-rGO in A549 cells based on FACS results. The experiment was conducted without serum (A, C) and with serum (B, D).

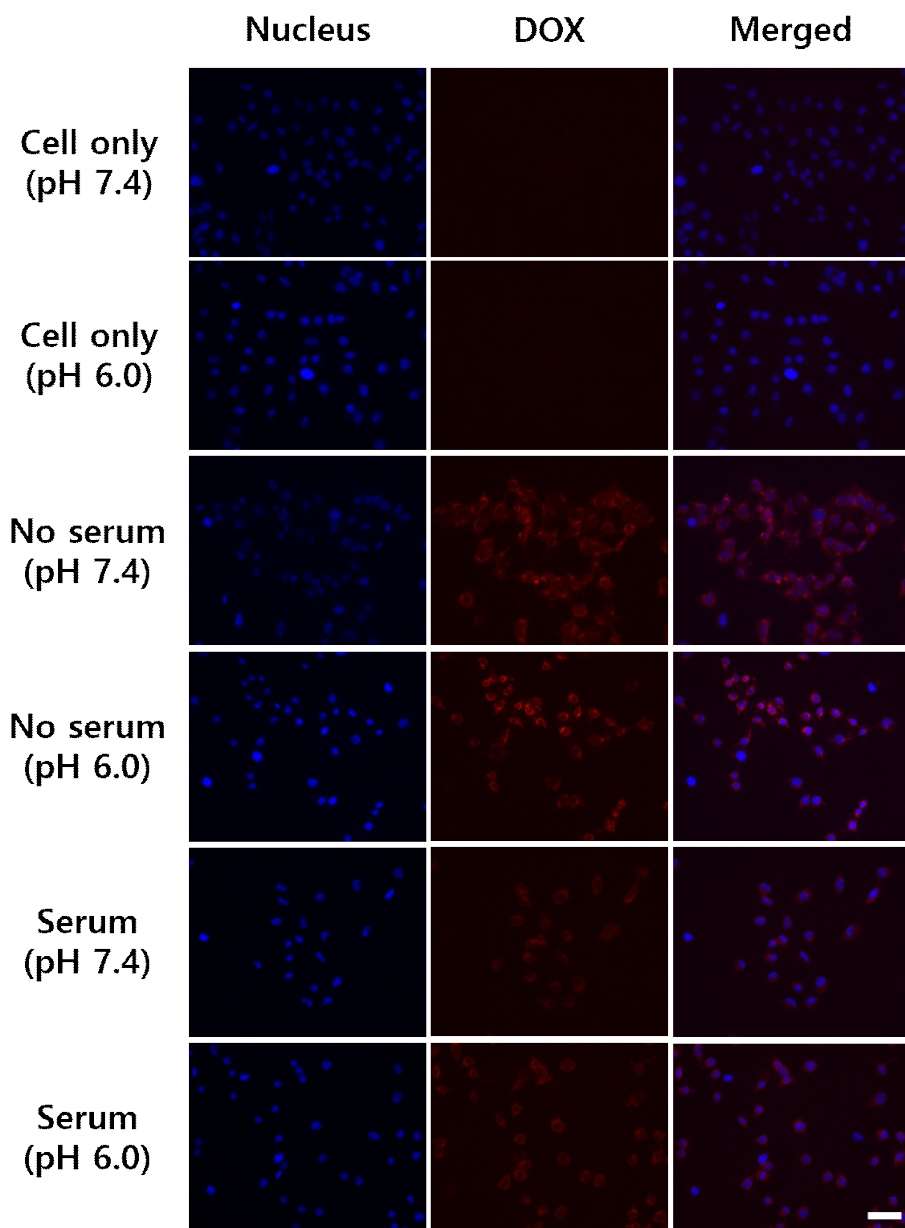


Figure 48. Fluorescence microscopy images of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in HeLa cells with different pH and serum conditions (7.4, 6.0, and without serum, with serum). Scale bar = 50  $\mu$ m.

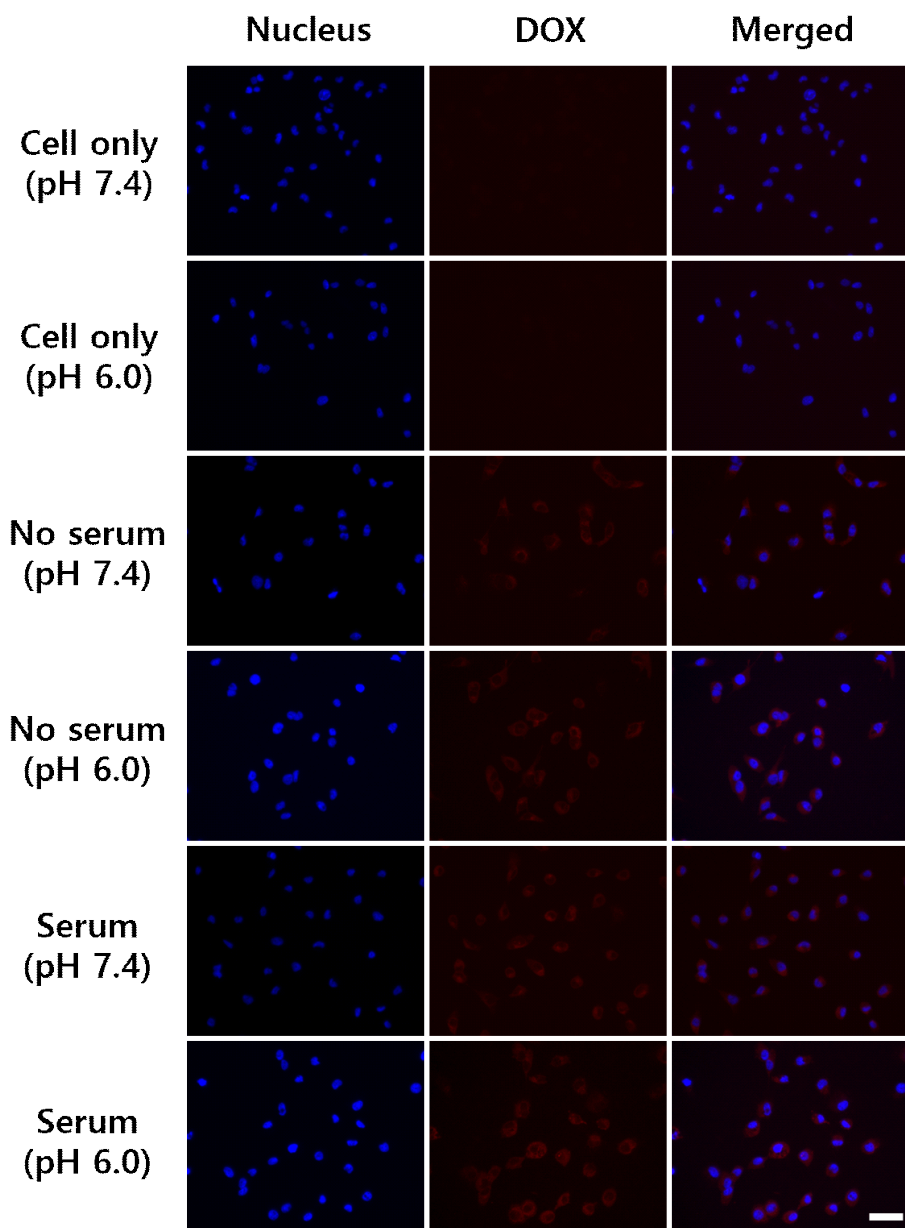


Figure 49. Fluorescence microscopy images of PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX in A549 cells with different pH and serum conditions (7.4, 6.0, and without serum, with serum). Scale bar = 50  $\mu$ m.

진행하였다. PLG1.5를 이용한 PEI-rGO/DOX의 코팅은 pH에 따른 DLS와 TEM 결과를 통해 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다. 코팅 후 혈청 단백질에 대한 저항성을 확인하였고, 시간과 pH, 환원성 조건에 따라 DOX이 방출되었다. MTT 실험을 통해 PLG1.5를 코팅한 PEI-rGO/DOX의 항암 효과를 확인하였고, HeLa, A549 세포실험을 통해 혈청 단백질이 있는 약산성 조건에서 향상된 암세포 사멸 효과를 보였다. FACS 결과는 PLG 코팅 이후에도 PEI-rGO/DOX는 세포에 정상적으로 투과되고 있음을 보여주었고, 특히 혈청 단백질 조건에서 생체 활성 pH에서 보다 pH 6.0에서 세포 투과가 증진되었다. pH에 대한 전하 전환성을 갖는 PLG 코팅을 이용하여 PEI-rGO가 갖는 혈청 단백질에 대한 저항성을 부여하였고, 혈청 단백질이 포함된 약산성 조건에서 증진된 암세포 사멸 효과로 미루어 다음의 도식으로 위 실험 결과를 나타내었다 (Figure 507). PLG 고분자의 코팅은 산화 그래핀 기반 약물 전달 분야에서 고분자와 산화 그래핀 간 상호작용을 통해 암세포 사멸 효과를 향상시키는 연구에 시사하는 바가 있었다.

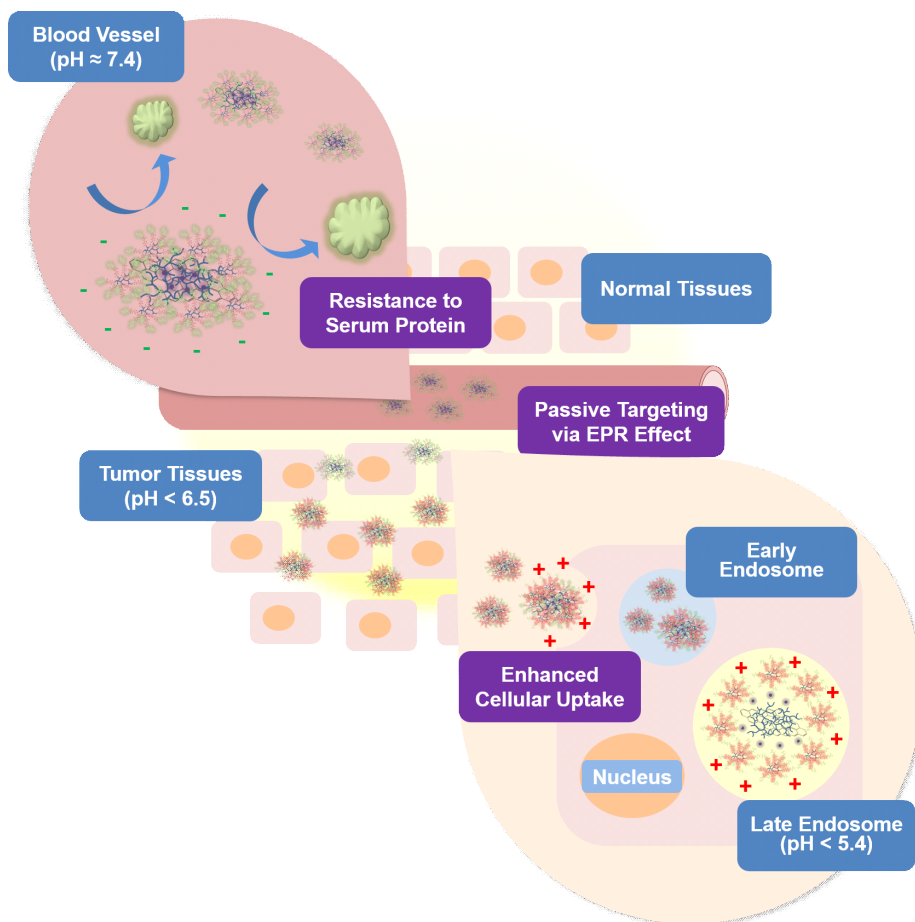


Figure 50. Schematics of the PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX particles from blood vessel to cell penetration.

## 4.4 PLG를 이용한 PEI 개질 메틸셀룰로오스 (MCPEI) 기반 약물 전달 시스템

### 4.4.1 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 제조, 약물 담지 및 함량 확인

MCPEI는 물에 대한 용해성도 뛰어나고 많은 아민기를 가지고 있어 메틸셀룰로오스 기반의 DOX 전달 시스템으로써 잠재성을 가지고 있다. 본 연구에서 사용한 MCPEI는 Kim의 연구와 동일한 방법을 이용하여 합성하였다 [28]. 분자량 1,800 Da의 PEI를 메틸셀룰로오스에 접합하였고, 메틸셀룰로오스의 글루코오스 단위체 9.87개당 1개의 PEI 분자가 접합되었다.

MCPEI 및 전하 전환성 고분자 기반 DOX 전달체의 DOX 담지를 진행하였다. 전하 전환성 고분자는 PLG1.0, PLG2.7를 사용하였다. PLG 고분자 중 두 고분자의 경우 음이온/양이온 비율이 각각 0.64, 1.69로 양이온성과 음이온성이 상대적으로 높은 고분자들로 글루탐산의 비율의 차이를 갖는다. 앞서 산-염기 적정 실험 및 PLG를 이용한 유전자 전달 연구에서 확인하였듯 글루탐산의 비율은 고분자의 양성자화 과정에서 완충 용량에 영향을 미치고, MCPEI/DOX 입자의 안정된 구조를 전하 전환성 고분자가 산성 조건에서 탈안정화시키며 DOX의 방출을 유도할 것이라고 예측하였다.

Table 7에서 확인할 수 있듯이 개질하지 않은 메틸셀룰로오스는 0.4%의 매우 낮은 DOX 담지 효율을 보였다. 반면에 MCPEI 및 PLG 고분자 기반의 전달체인 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX, MCPEI+PLG2.7/DOX는 각각 63.9%, 77.9%, 74.7%의 높은 DOX 담지 효율 (DLE) 및 31.9%, 14.7%, 23.4%의 DOX 함유량 (DLC)를 나타냈다.

Table 7. DOX loading profiles of MC, PEI25k, MCPEI and PLG polymers based DOX delivery systems.

	Weight (mg)	DOX weight (mg)	DLE (%)	DLC (%)
MC/DOX	3	0.004	0.4	0.1
MCPEI/DOX	2	0.639	63.9	31.9
MCPEI+PLG1.0 /DOX	5.3	0.779	77.9	14.7
MCPEI+PLG2.7 /DOX	3.2	0.747	74.7	23.4
PEI25k/DOX	3.5	0.93	93.1	26.6

그리고 PEI25k의 DOX 담지 효과를 확인한 결과 DOX 담지 효율이 93.1%로 매우 높은 효율을 갖는 것을 확인하였다. 즉, MCPEI는 PEI로 개질되었기 때문에 아민기를 다량 함유하고 있어 DOX를 담지하는데 있어 PEI로 개질하지 않은 메틸셀룰로오스보다 유리하였다. 즉, MCPEI의 PEI 부분이 DOX를 담지할 수 있는 능력을 부여한다고 볼 수 있다 [128].

#### 4.4.2 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체 입자의 특성 분석

DLS를 이용하여 제조한 MCPEI 기반 DOX 전달체들의 입자 크기 및 표면 전하를 측정하였다 (Figure 51). 입자의 크기와 표면 전하는 생체 pH, 종양 조직의 pH, 엔도솜 내부의 pH를 가상으로 하여 세 가지 pH 조건 (pH 7.4, 6.0, 5.0)에서 측정하였다.

MCPEI/DOX 입자는 pH 7.4에서 293.6 nm, +33.9 mV의 크기와 표면 전하를 갖는 안정적 입자를 형성하고 있었다. 약산성 조건에서는 입자의 크기가 630.8 nm으로 증가하였고, 표면 전하는 +32.0 mV으로 큰 변화가 나타나지는 않았다. pH 5.0에서는 533.8 nm로 pH 6.0에서 약간 감소하였지만 pH 7.4에서 보다는 큰 입자가 확인되었다. 또 표면 전하는 +27.5 mV로 pH 7.4, 6.0에서의 표면 제타 전위 값보다 소폭 감소하였다. MCPEI+PLG1.0/DOX의 경우 입자 크기는 MCPEI/DOX와 유사한 경향을 보였다. pH 7.4에서 MCPEI+PLG1.0/DOX의 입자 크기는 447.6 nm, pH 6.0에서는 660.3 nm, pH 5.0에서는 341.7 nm 값을 나타냈다. 표면 전하는 pH 7.4와 6.0에서는 +32.8 mV, +33 mV로 유지되다 pH 5.0에서 +40.6 mV로 증가하였다. MCPEI+PLG2.7/DOX는 pH 7.4에서 약 1038 nm 크기의 다소



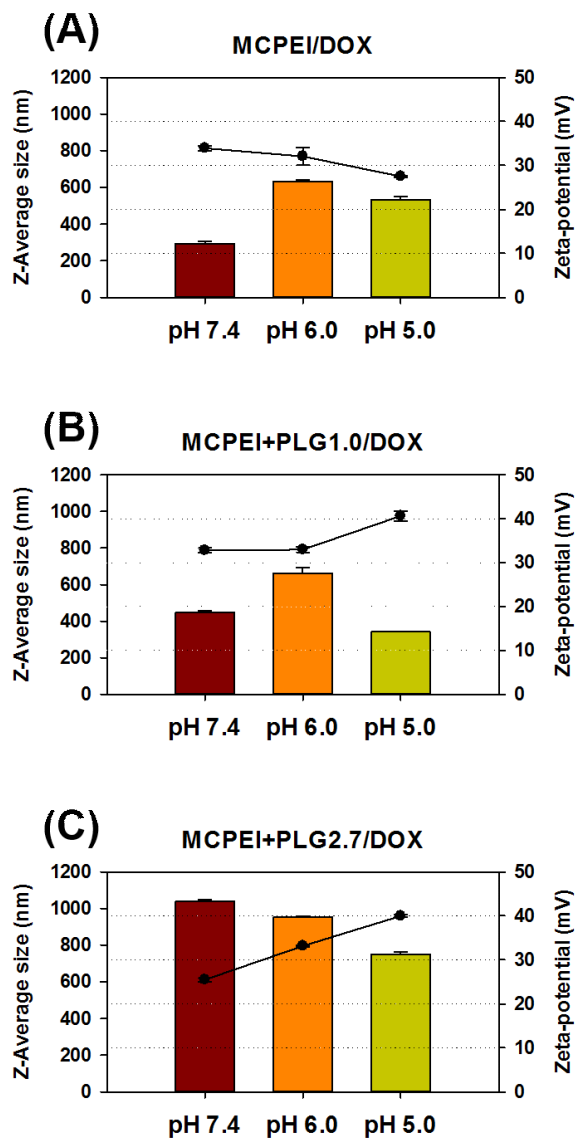


Figure 51. Z-Average sizes and zeta-potentials of MCPEI and MCPEI+charge conversion polymer based DOX delivery systems with pH 7.4, 6.0 and 5.0. (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX, (C) MCPEI+PLG2.7/DOX

큰 입자를 형성하였다. 이는 음이온성을 갖는 PLG2.7이 MCPEI와 polyion complex (PIC)를 형성하기 때문으로 볼 수 있다. PIC 입자는 양이온성 고분자 (Polycation) 용액과 음이온성 고분자 (Polyanion) 용액의 단순한 혼합을 통해 제조할 수 있는 입자이다. PIC는 1차로 형성된 PIC 입자끼리의 자가 응집 (self-aggregation) 반응을 통해 더 큰 크기를 갖는 콜로이드성 2차 복합체를 형성하기도 한다 [129, 130]. MCPEI+PLG2.7/DOX 입자는 pH가 감소함에 따라 입자 크기 역시 감소하였고 (1038 nm, 951.7 nm, 751.4 nm), 입자 표면의 제타 전위값은 점진적으로 증가하였다 (+25.5 mV, +33.1 mV, +40.0 mV).

DLS 결과를 통해 확인한 결과 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX는 약산성 조건에서 양이온성 고분자의 양성자화가 이루어지며 입자 내 양성자화된 분자들의 정전기적 반발력에 의해 입자의 크기가 증가하였다. MCPEI/DOX는 pH 5.0 조건에서 입자 크기의 큰 변화는 없었지만 MCPEI+PLG1.0/DOX는 PLG1.0이 입자에서 해리되며 원래 MCPEI/DOX 입자의 크기와 표면 전하 값으로 돌아가는 경향을 보였다. 반면 MCPEI+PLG2.7/DOX의 경우 고분자끼리 PIC를 형성하며 응집되어 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX 입자보다 상대적으로 큰 크기의 입자를 형성하였다. 그리고 pH가 감소함에 따라 입자의 크기도 지속적으로 감소하였고 표면 전하값은 점진적으로 증가하였다. 이는 PLG2.7의 음이온성이 산성 조건에서 일부 양이온으로 전환되며 PIC 2차 응집 입자가 응축되면서 발생하는 현상으로 볼 수 있다. 그리고 표면 전하의 경우 산성 조건에서 전하 전환성 고분자들이 양이온으로의 전환이 발생하며 입자 표면의 제타 전위가 증가하였다 (Figure 52).

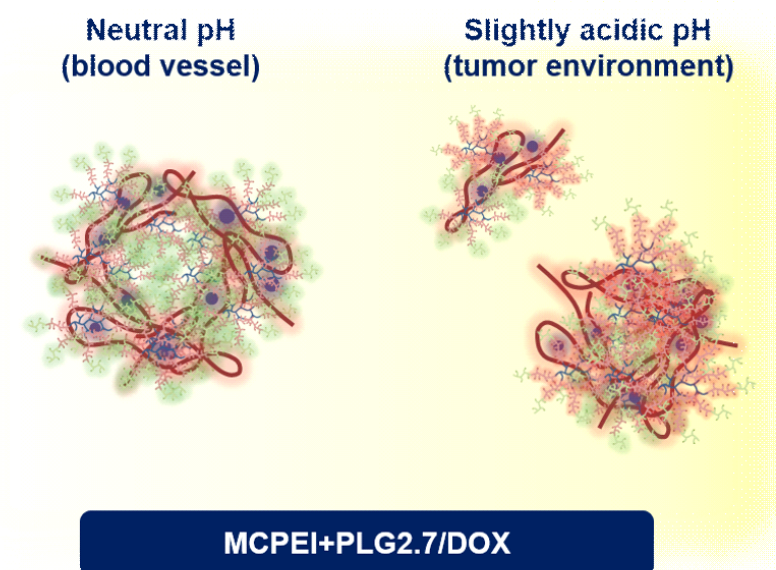


Figure 52. Schematics of MCPEI+PLG2.7/DOX particle at neutral and slightly acidic pH conditions.

pH 7.4, 5.0 조건에서 24시간 동안 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX, MCPEI+PLG2.7/DOX 각각의 약물 전달체의 약물 방출 거동을 확인하였다 (Figure 53). MCPEI/DOX와 MCPEI+PLG1.0/DOX는 방출 실험 초반 4시간까지는 pH 7.4 조건보다 pH 6.0 조건에서 방출량이 더 높게 나타났다. 그러나 8시간 이후 pH 7.4에서의 방출량과 pH 6.0에서의 방출량은 큰 차이를 보이지 않았다. MCPEI/DOX의 경우 24시간에서의 pH 7.4, pH 6.0에서의 약물 방출량은 각각 30.5%, 33.0%였다. 그리고 MCPEI+PLG1.0/DOX의 24시간에서 pH 7.4, pH 6.0에서 약물 방출량은 각각 27.7%, 37.6%였다. 반면 MCPEI+PLG2.7/DOX는 pH에 따른 약물 방출량의 차이가 확연하게 나타났다. 방출 실험 2시간 이후 pH 7.4, pH 6.0에서의 약물 방출량은 각각 13.6%, 37.6%로 약 2.8배 높은 약물 방출량을 나타내었고, 실험 12시간, 24시간 이후에서는 각각 22.7% (pH 7.4) 48.1% (pH 6.0), 26.3% (pH 7.4), 52.5% (pH 6.0)로 산성 조건에서 약물 방출량이 크게 증가하였다. MCPEI 및 MCPEI+PLG1.0 전달 시스템은 pH에 따른 효과가 미미하였으나 MCPEI+PLG2.7 전달 시스템은 pH에 따른 효과가 크게 나타났다. 이는 MCPEI+PLG2.7 입자가 DOX를 담지하고 있는 상태에서 PLG2.7 고분자가 pH 7.4 조건에서는 상대적으로 강한 음이온성으로 입자 내 DOX를 안정적으로 유지하다 pH 6.0 조건에서 일부 PEI의 아민기 및 라이신의 양성자화를 통해 양이온성을 나타내며 DOX를 방출시켰기 때문이라고 볼 수 있다.

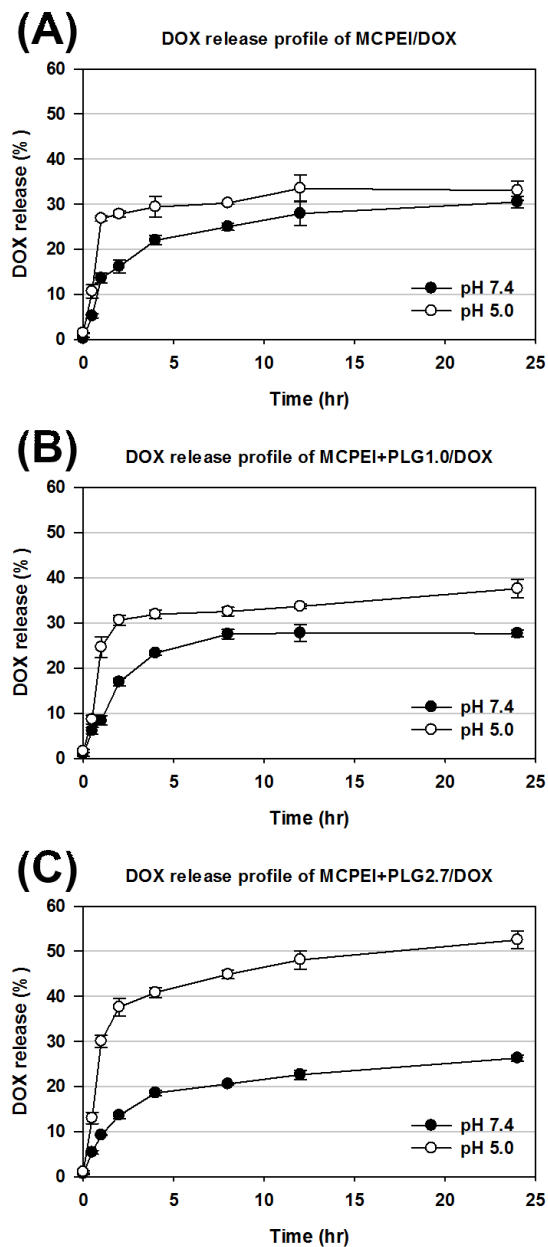


Figure 53. DOX release profile of MCPEI and MCPEI+PLG polymers based DOX delivery systems. (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX, (C) MCPEI+PLG2.7/DOX

#### 4.4.3 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체의 암세포 사멸 효과 평가

MTT 실험을 이용하여 HeLa 세포와 A549 세포에서의 MCPEI 및 PLG 고분자 기반 DOX 전달체의 세포 대사 활성 실험을 진행하였다. HeLa 세포에서 MCPEI 기반의 DOX 전달체들은 대체로 높은 세포 대사 활성 감소 효과를 나타냈다 (Figure 54). HeLa 세포에서 DOX만 처리한 결과 산성 조건에서 p-glycoprotein의 활성화로 인해 약물의 효과가 감소하였다. 그러나 MCPEI 기반의 약물 전달체를 사용하여 실험한 결과 산성 조건에서도 약물의 유출 (efflux) 없이 pH 7.4와 유사한 수준의 세포 사멸 효과가 나타나는 것을 확인하였다. MCPEI+PLG2.7/DOX를 처리한 HeLa 세포의 상대적 세포 생존률은 DOX 농도 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 pH에 따라 각각 59.8% 35.1% 19.4% (pH 7.4), 51.2%, 24.8%, 16.9% (pH 6.0)를 보이며 산성 조건에서 세포 사멸 효과가 소폭 상승한 것을 확인하였고 MCPEI+PLG2.7/DOX는 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX 보다 높은 수준의 세포 사멸 효과를 나타내었다.

A549 세포에서는 전체적으로 HeLa 세포보다 낮은 암세포 사멸 효과를 보였다 (Figure 55). DOX만 처리하였을 경우 A549 세포에서는 HeLa 세포와 유사한 세포 거동을 보였으나 전달체를 함께 사용한 경우 MCPEI/DOX와 MCPEI+PLG1.0/DOX는 모든 DOX 농도에서 pH 7.4에 비해 pH 6.0의 세포 대사 활성 감소 효과가 저해되는 경향성을 보였다. 이는 마찬가지로 p-glycoprotein의 활성화 때문인 것으로 볼 수 있다. 그러나 MCPEI+PLG2.7/DOX는 앞서 확인한 바와 같이 산성 조건에서 약물의 방출이 상승하였고, 이는 결국 pH 6.0에서 세포 사멸 효과가 크게 감소하지 않는 결과로 나타났다.

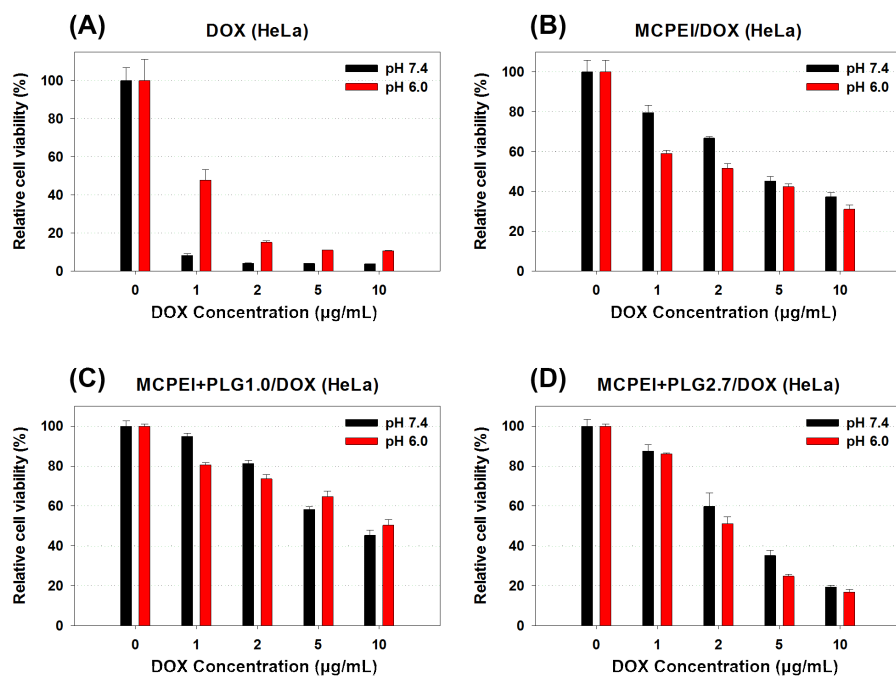


Figure 54. Anticancer activity evaluation by MTT assay of (A) DOX only, (B) MCPEI/DOX, (C) MCPEI+PLG1.0/DOX and (D) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells with pH 7.4 (black bar) and 6.0 (red bar).

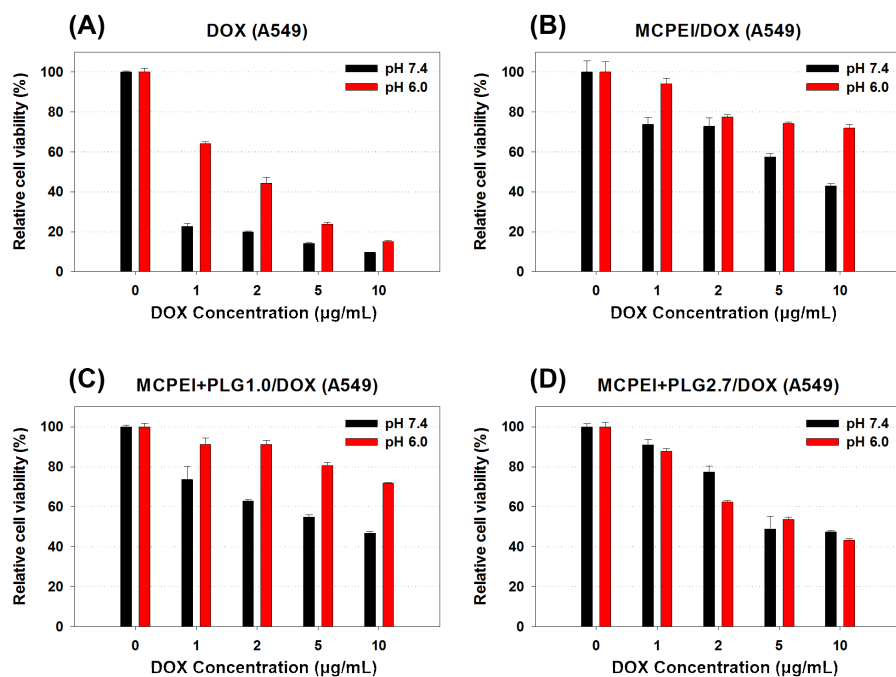


Figure 55. Anticancer activity evaluation by MTT assay of (A) DOX only, (B) MCPEI/DOX, (C) MCPEI+PLG1.0/DOX and (D) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells with pH 7.4 (black bar) and 6.0 (red bar).



#### 4.4.4 MCPEI 및 PLG 기반 DOX 전달체의 세포 투과율 평가

Flow cytometry를 이용하여 MCPEI 기반의 DOX 전달 시스템의 세포 투과도를 확인하였다. HeLa 세포에서 MCPEI/DOX는 pH가 감소함에 따라 세포 투과도가 크게 감소하였다. 그리고 MCPEI+PLG1.0/DOX와 MCPEI+PLG2.7/DOX 역시 약산성에서 세포 투과도가 약간 감소하였다 (Figure 56). 평균 형광 강도를 통해서 확인해 본 결과 역시 pH 6.0에서 모든 전달체가 pH 7.4에서의 형광 강도보다 감소하였음을 확인하였다 (Figure 57). 그러나 pH 6.0에서 MCPEI+PLG2.7/DOX의 평균 형광 강도 값이 제일 높게 나왔고, 이는 앞선 MTT 실험과 서로 부합하는 결과를 보였다.

A549 세포에서는 pH 7.4에 비해 pH 6.0에서 모든 실험군의 세포 투과도가 감소하였다 (Figure 58). 그중에서도 MCPEI/DOX와 MCPEI+PLG1.0/DOX의 세포 투과율 감소가 두드러졌고, 이는 앞선 MTT 결과에서도 확인할 수 있었다. 평균 형광 강도 역시 FACS 결과와 유사하였다 (Figure 59). 그러나 MCPEI+PLG2.7/DOX의 경우 pH 7.4에서 높은 형광 강도를 보여주었고 pH 6.0에서는 pH 7.4에서의 형광보다 소폭 감소하지만 역시 다른 MCPEI/DOX, MCPEI+PLG1.0/DOX 보다 높은 수준의 형광 강도를 나타내었다.

4.4에서는 PEI로 개질한 메틸셀룰로오스를 전하 전환성 고분자와 함께 이용한 DOX 전달 시스템에 대한 연구를 진행하였다. 메틸셀룰로오스 기반의 약물 전달 시스템은 주로 온도 변화에 초점을 맞추어 연구가 진행되어 왔다. 그러나 본 연구에서는 PEI로 개질된 메틸셀룰로오스를 이용하여 높은 용해성과 생체 적합성 등 메틸셀룰로오스가 갖는 고유의 장점과 함께 PEI 개질로 인한 DOX 담지 능력을

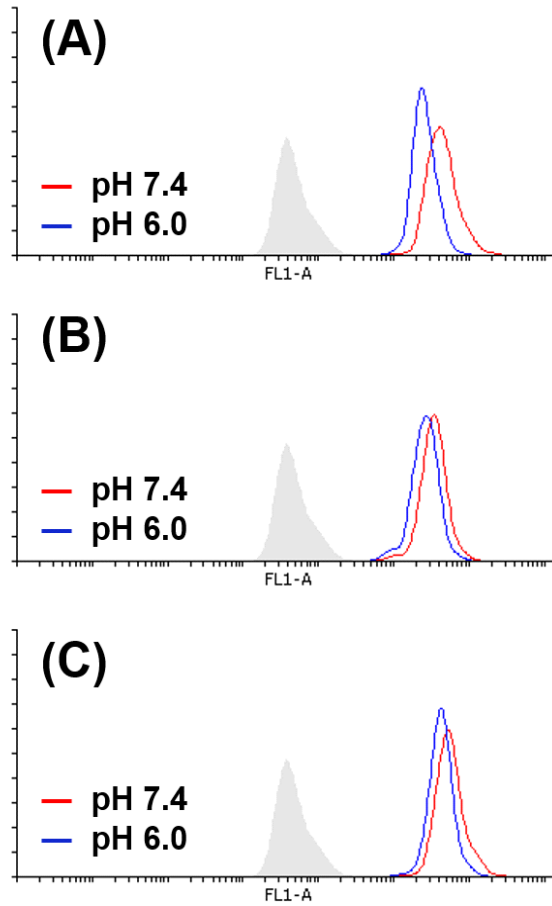


Figure 56. Flow cytometry results of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells. The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

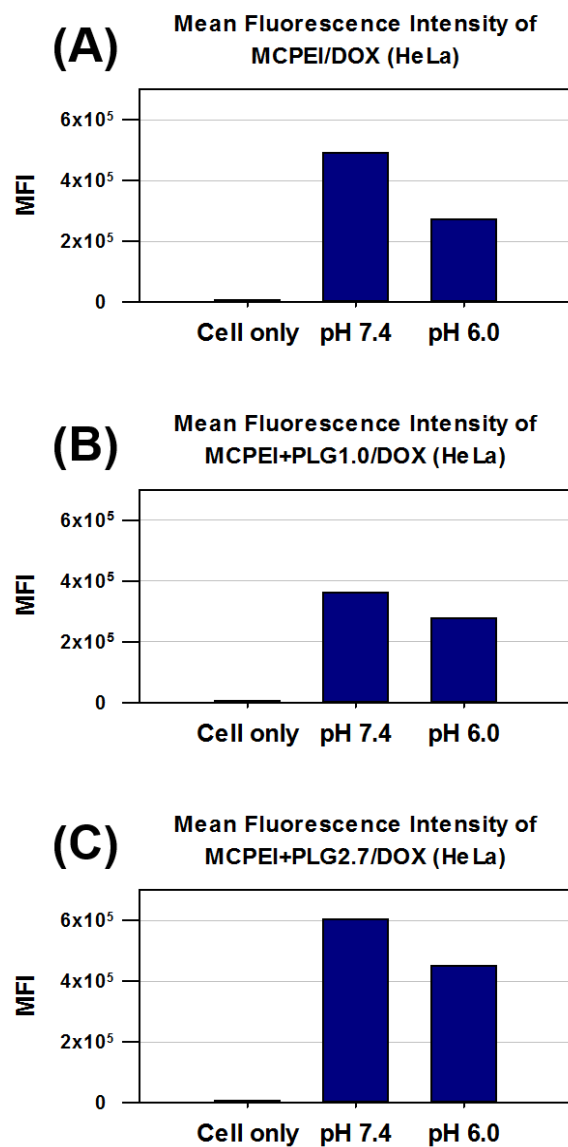


Figure 57. Mean fluorescence intensity of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in HeLa cells based on FACS results.

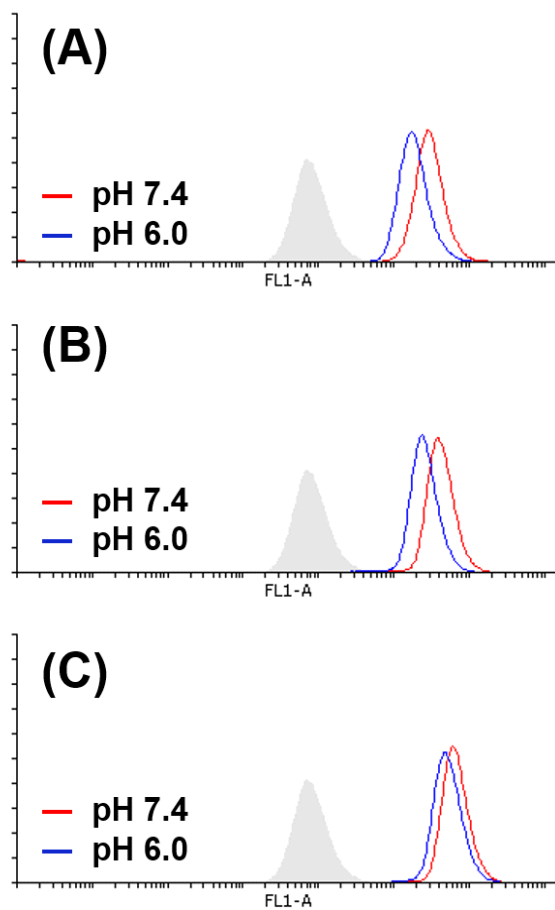


Figure 58. Flow cytometry results of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells. The red and blue lines represent pH 7.4 and pH 6.0, respectively.

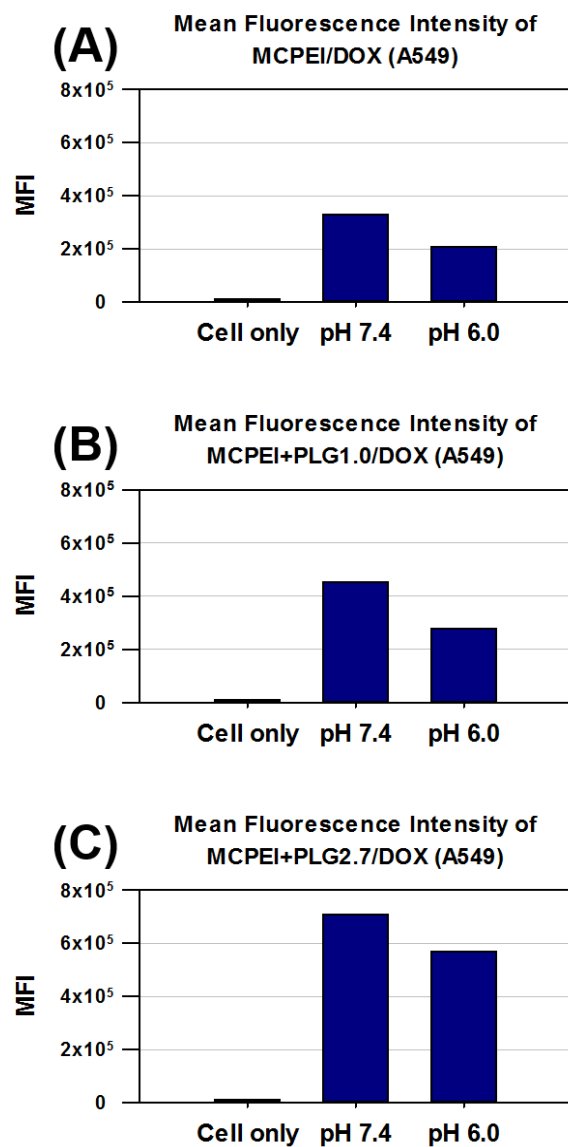


Figure 59. Mean fluorescence intensity of (A) MCPEI/DOX, (B) MCPEI+PLG1.0/DOX and (C) MCPEI+PLG2.7/DOX in A549 cells based on FACS results.

이용하여 연구를 진행하였다. 그러나 MCPEI는 DOX에 대한 높은 담지 효율은 가지고 있었지만 종양 조직과 엔도솜 내 pH 환경 등에 대한 특별한 감응성을 갖고 있지 않았다. 따라서 앞서 합성하였던 pH에 대한 감응성을 갖는 PLG 고분자 (PLG1.0, PLG2.7)를 이용하여 MCPEI 기반의 DOX 전달 시스템을 제조하였다. 그 중에서도 음이온성 고분자인 PLG2.7을 포함한 MCPEI 기반 DOX 전달 시스템은 MCPEI 기반의 다른 전달체에 비해 산성 조건에서 DOX의 방출이 향상되었고 결과적으로 세포 사멸 효과가 뛰어난 MTT와 FACS 실험을 통해 확인하였다.

## 제 5 장 결 론

지금까지 pH 감응성을 갖는 전하 전환성 고분자의 합성과 특성 분석 그리고 유전자 전달체 및 약물 전달체로의 응용에 대한 연구를 진행하였다. 본 고분자는 정상 조직과 종양 조직 사이의 산성도 차이에 따라 음전하에서 양전하로 전환되는 특징을 갖고 있다. 본 고분자를 이용하여 종양 조직 미세 환경을 모사한 혈청 단백질이 있는 약산성 조건에서 유전자 및 약물 전달에 의한 암세포 사멸 효과를 확인하였다.

pH 감응성을 갖는 전하 전환성 고분자로 PEI-Lys의 말단에 글루탐산을 도입하여 폴리펩타이드 구조를 갖는 PEI-Lys-Glu (PLG)를 이용하였다.  $^1\text{H}$  NMR을 이용한 구조 분석 결과 PLG는 넣어진 BGlu-NCA의 비율에 따라 각각 53.4, 75.9, 93.7, 140.5개의 글루탐산이 PEI-Lys의 말단으로부터 연속적으로 합성이 되었음을 확인하였다. PLG는 라이신과 글루탐산 사이의 비율을 이용하여 각각 PLG1.0, PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7로 명명하였다. PLG는 pH 7.4, 6.0, 혈청 단백질 유무 조건에서 세포 대사 활성 감소가 거의 나타나지 않았다. PLG 고분자는 자체로 입자를 형성하였으며, 산성, 염기성 조건에서는 라이신과 글루탐산의 R그룹 사이의 정전기적 상호작용에 의한 작은 입자가, 중성 조건에서는 형성된 입자의 응집을 통한 입자가 형성되었다. 또한 PLG는 산-염기 적정 실험을 통해 글루탐산의 비율이 증가할수록  $\text{pK}_a$  값과 완충 효과가 크게 나타났다.

PLG를 이용하여 유전자 전달 시스템에 관한 연구를 진행하였다. PLG1.5, PLG1.8, PLG2.7 세 고분자를 이용하였고, PLG1.8이 유전자

전달체로써 가장 적합한 효율과 특성을 보였다. PLG1.8은 무게비 40이상에서 효과적으로 pDNA와 복합체를 형성하였고, 폴리플렉스는 정전기적 인력을 통해 형성됨을 확인하였다. PLG 폴리플렉스는 무게비가 증가할수록 pH에 대한 전하 전환성 효과가 뚜렷하게 나타났다. PLG1.8 폴리플렉스를 이용하여 HeLa 및 A549 세포주에서 transfection 실험을 진행하였고, 혈청 단백질을 포함하는 약산성 조건에서 정상 pH 조건보다 유전자 전달 및 단백질 발현 효율이 크게 증가함을 확인하였다. PLG1.8은 치료용 유전자를 이용한 실험에서도 약산성, 혈청 단백질 조건에서 암세포 사멸 효과가 향상되었다.

PLG를 이용하여 산화 그래핀 기반의 약물 전달 시스템을 코팅하고 이에 대한 연구를 진행하였다. 총 4종류의 PLG 고분자 중 PEI-rGO 중 적절한 전하-전환성 효과를 나타내는 무게비 30의 PLG1.5를 선택하여 이후 실험을 진행하였다. PLG1.5로 코팅한 PEI-rGO는 혈청 단백질에 대한 안정성을 갖고 있었으며, HeLa 및 A549에서의 MTT 실험 결과 혈청 단백질을 포함하는 약산성 조건에서 향상된 암세포 사멸 효과를 확인하였다.

PEI로 개질한 메틸셀룰로오스 기반 약물 전달 시스템은 PLG를 이용하여 pH에 대한 전하 전환성을 부여하였다. PLG2.7이 함께 포함된 MCPEI+PLG2.7/DOX는 PIC 구조를 형성하여 비교적 입자의 크기가 컸으며, 산성 조건에서 MCPEI/DOX 및 MCPEI+PLG1.0/DOX보다 약물의 방출량이 증가하였다. 또한 MCPEI+PLG2.7/DOX는 산성 조건에서 세포 투과도가 소폭 향상되어 암세포 사멸 효과가 증가하였다.

본 논문에서는 pH 감응성을 갖는 전하 전환성 고분자를 이용하여 유전자 및 약물 전달체로의 연구를 진행하였다. 유전자 전달체로



PLG 고분자를 직접 이용하였고, 약물 전달체로 본 고분자와 PEI 개질 산화 그래핀 및 PEI 개질 메틸셀룰로오스를 함께 이용하여 전달 시스템에 전하 전환성질을 부여하였다. 이 연구를 통해 pH 감응성을 갖는 고분자뿐만 아니라 환원성 환경, 온도, 특정 효소 등 다양한 자극에 대한 반응성을 갖는 지능형 유전자 및 약물 전달체에 대한 연구가 이루어져 많은 질병에서의 효과적인 치료가 진행될 수 있기를 기대한다.

## 참고 문헌

- [1] S. F. Amato, R. M. E. Jr, Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices, *Elsevier*, 3 (2014)
- [2] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, and G. M. Eccleston, Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 2892-2923 (2007)
- [3] J. Boateng, O. Catanzano, Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing – A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 3653-3680 (2015)
- [4] X. Lin, S. Yang, K. Lai, H. Yang, T. J. Webster, and L. Yang, Orthopedic Implant Biomaterials with Both Osteogenic and Anti-Infection Capacities and Associated *in vivo* Evaluation Methods, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13, 123-142 (2017)
- [5] D. M. Martin, F. J. Boyle, Drug-eluting Stents for Coronary Artery Disease: A Review, *Medical Engineering & Physics*, 33, 148-163 (2011)
- [6] N. Larson, H. Ghandehari, Polymeric Conjugates for Drug Delivery, *Chemistry of Materials*, 24, 840-853 (2012)
- [7] G. Lin, H. Zhang, and L. Huang, Smart Polymeric Nanoparticles for Cancer Gene Delivery, *Molecular Pharmaceutics*, 12, 314-321 (2015)

- [8] H. Ringsdorf, Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers, *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 51, 135–153 (1975)
- [9] F. M. Molina, Gene Therapy – Tools and Potential Applications, InTech, Chapter 9, (2013)
- [10] A. S. Hoffman, The Origins and Evolution of “Controlled” Drug Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, 132, 153–163 (2008)
- [11] A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, and H. Car, Nanoparticles as Drug Delivery Systems, *Pharmacological Reports*, 64, 1020–1037 (2012)
- [12] K. Park, Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back, *Journal of Controlled Release*, 190, 3–8 (2014)
- [13] M. W. Tibbitt, J. E. Dahlman, and R. Langer, Emerging Frontiers in Drug Delivery, *Journal of the American Chemical Society*, 138, 704–717 (2016)
- [14] T. G. Park, J. H. Jeong, and S. W. Kim, Current Status of Polymeric Gene Delivery Systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 467–486 (2006)
- [15] S. Li, L. Huang, Nonviral Gene Therapy: Promises and Challenges, *Gene Therapy*, 7, 31–34 (2000)
- [16] T. Niidome, L. Huang, Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral Vectors, *Gene therapy*, 9, 1647–1652 (2002)

- [17] C. Scholz, E. Wagner, Therapeutic Plasmid DNA versus siRNA Delivery: Common and Different Tasks for Synthetic Carriers, *Journal of Controlled Release*, 161, 554-565 (2012)
- [18] W. H. Chen, G. F. Luo, Q. Lei, H. Z. Jia, S. Hong, Q. R. Wang, R. X. Zhuo and X. Z. Zhang, MMP-2 Responsive Polymeric Micelles for Cancer-targeted Intracellular Drug Delivery, *Royal Society of Chemistry*, 51, 465-468 (2015)
- [19] J. Zhong, L. Li, X. Zhu, S. Guan, Q. Yang, Z. Zhou, Z. Zhang, and Y. Huang, A Smart Polymeric Platform for Multistage Nucleus-targeted Anticancer Drug Delivery, *Biomaterials*, 65, 43-55 (2015)
- [20] L. Jiang, L. Li, X. He, Q. Yi, B. He, J. Cao, W. Pan, and Z. Gu, Overcoming Drug-resistant Lung Cancer by Paclitaxel Loaded Dual-functional Liposomes with Mitochondria Targeting and pH-response, *Biomaterials*, 52, 126-139 (2015)
- [21] A. A. Faraj, A. S. Shaik, E. Ratemi, and R. Halwani, Combination of Drug-conjugated SWCNT Nanocarriers for Efficient Therapy of Cancer Stem Cells in a Breast Cancer Animal Model, *Journal of Controlled Release*, 225, 240-251 (2016)
- [22] H. Kim, D. Lee, J. Kim, T. Kim and W. J. Kim, Photothermally Triggered Cytosolic Drug Delivery via Endosome Disruption Using a Functionalized Reduced Graphene Oxide, *ACS Nano*, 7, 6735-6746 (2013)
- [23] J. Zhang, Z. F. Yuan, Y. Wang, W. H. Chen, G. F. Luo, S.

- X. Cheng, R. X. Zhuo, and X. Z. Zhang, Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor-Triggered Targeting Drug Delivery, *Journal of the American Chemical Society*, 135, 5068–5073 (2013)
- [24] K. Y. J. Lee, Y. Wang, and S. Nie, *in vitro* Study of a pH-sensitive Multifunctional Doxorubicin-gold Nanoparticle System: Therapeutic Effect and Surface Enhanced Raman Scattering, *RSC Advances*, 5, 65651–65659 (2015)
- [25] H. J. Kim, K. Ryu, J. H. Kang, A. J. Choi, T. I. Kim, and J. I. Oh, Anticancer Activity of Ferulic Acid-Inorganic Nanohybrids Synthesized via Two Different Hybridization Routes, Reconstruction and Exfoliation-Reassembly, *The Scientific World Journal*, 2013, 1–9 (2013)
- [26] T. Kim, M. Ou, M. Lee, and S. W. Kim, Arginine-grafted Bioreducible Poly(disulfide amine) for Gene Delivery Systems, *Biomaterials*, 30, 658–664 (2009)
- [27] T. Kim, M. Lee, and S. W. Kim, A Guanidinylated Bioreducible Polymer with High Nuclear Localization Ability for Gene Delivery Systems, *Biomaterials*, 31, 1798–1804 (2010)
- [28] K. Kim, K. Ryu, and T. Kim, Cationic Methylcellulose Derivative with Serum-compatibility and Endosome Buffering Ability for Gene Delivery Systems, *Carbohydrate Polymers*, 110, 268–277 (2014)
- [29] J. Choi, K. Ryu, G. J. Lee, K. Kim, and T. Kim, Agmatine-Containing Bioreducible Polymer for Gene Delivery

- Systems and Its Dual Degradation Behavior, *Biomacromolecules*, 16, 2715–2725 (2015)
- [30] H. Maeda, The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting, *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 189 - 207 (2001)
- [31] S. Biswas, V. P. Torchilin, Nanopreparations for Organelle-specific Delivery in Cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 26–41 (2014)
- [32] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, and X. J. Liang, pH-sensitive Nano-systems for Drug Delivery in Cancer Therapy, *Biotechnology Advances*, 32, 693–710 (2014)
- [33] Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama and K. Kataoka, Charge-conversion Ternary Polyplex with Endosome Disruption Moiety: A Technique for Efficient and Safe Gene Delivery, *Angewandte Chemie*, 47, 5163–5166 (2008)
- [34] S. Kim, D. J. Lee, D. S. Kwag, U. Y. Lee, Y. S. Youn, and E. S. Lee, Acid pH-activated Glycol Chitosan/Fullerene Nanogels for Efficient Tumor Therapy, *Carbohydrate Polymers*, 101, 692–698 (2014)
- [35] F. Yuan, S. Wang, G. Chen, K. Tu, H. Jiang, and L. Q. Wang, Novel Chitosan-based pH Sensitive and Disintegrable Polyelectrolyte Nanogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 194–201 (2014)

- [36] S. Kang, Y. Kim, Y. Song, J. U. Choi, E. Park, W. Choi, J. Park, and Y. Lee, Comparison of pH-sensitive Degradability of Maleic Acid Amide Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 2364–2367 (2014)
- [37] J. Zhou, W. J. Murdoch, and Y. Shen, A Linear Polyethylenimine (LPEI) Drug Conjugate with Reversible Charge to Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells, *Polymer*, 76, 150–158 (2015)
- [38] L. Jiang, L. Li, X. He, Q. Yi, B. He, J. Cao, W. Pan, and Z. Gu, Overcoming Drug-resistant Lung Cancer by Paclitaxel Loaded Dual-functional Liposomes with Mitochondria Targeting and pH-response, *Biomaterials*, 52, 126–139 (2015)
- [39] Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, and K. Kataoka, A Protein Nanocarrier from Charge-Conversion Polymer in Response to Endosomal pH, *Journal of American Chemical Society*, 129, 5362–5363 (2007)
- [40] T. Zhou, X. Zhou, and D. Xing, Controlled Release of Doxorubicin from Graphene Oxide Based Charge-reversal Nanocarrier, *Biomaterials*, 13, 4185–4194 (2014)
- [41] X. Ding, Y. Liu, J. Li, Z. Luo, Y. Hu, B. Zhang, J. Liu, J. Zhou, and K. Cai, Hydrazone-bearing PMMA-functionalized Magnetic Nanocubes as pH-responsive Drug Carriers for Remotely Targeted Cancer Therapy *in vitro* and *in vivo*, *Applied Materials & Interfaces*, 6, 7395–7407 (2014)

- [42] J. Xia, J. Chen, H. Tian, and X. Chen, Synthesis and Characterization of a pH-sensitive Shielding System for Polycation Gene Carriers, *Science China Chemistry*, 53, 502–507 (2010)
- [43] H. Tian, Z. Guo, L. Lin, Z. Jiao, J. Chen, S. Gao, X. Zhu, and X. Chen, pH-responsive Zwitterionic Copolypeptides as Charge Conversional Shielding System for Gene Carriers, *Journal of Controlled Release*, 174, 117–125 (2014)
- [44] S. Lv, W. Song, Z. Tang, M. Li, H. Yu, H. Hong, and X. Chen, Charge-conversional PEG-polypeptide Polyionic Complex Nanoparticles from Simple Blending of a Pair of Oppositely Charged Block Copolymers as an Intelligent Vehicle for Efficient Antitumor Drug Delivery, *Molecular Pharmaceutics*, 11, 1562–1574 (2014)
- [45] X. Guan, Y. Li, Z. Jiao, L. Lin, J. Chen, Z. Guo, H. Tian, and X. Chen, Codelivery of Antitumor Drug and Gene by a pH-sensitive Charge-conversion System, *Applied Materials & Interfaces*, 7, 3207–3215 (2015)
- [46] J. Chen, X. Dong, T. Feng, L. Lin, Z. Guoa, J. Xia, H. Tian, and X. Chen, Charge-conversional Zwitterionic Copolymer as pH-sensitive Shielding System for Effective Tumor Treatment, *Acta Biomaterialia*, 26, 45–53 (2015)
- [47] J. R. Marrack and H. Hoch, Serum Proteins: A Review, *Journal of Clinical Pathology*, 2, 161–187 (1949)



- [48] S. C. De Smedt, J. Demeester and W. E. Hennink, Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems, *Pharmaceutical Research*, 17, 113–126 (2000)
- [49] O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. Behr, A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and *in vivo*: Polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7297–7301 (1995)
- [50] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, Poly(ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery, *Journal of Controlled Release*, 60, 149–160 (1999)
- [51] A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, and O. Danos, Polyethylenimine-mediated Gene Delivery: A Mechanistic Study, *The Journal of Gene Medicine*, 3, 135–144 (2001)
- [52] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, and A. Göpferich, PEI-based Non-viral Gene Delivery Systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 247–266 (2005)
- [53] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, Glutathione Metabolism and its Implications for Health, *The Journal of Nutrition*, 134, 489–492, (2004)
- [54] S.-Y. Kim, M. B. Heo, G.-S. Hwang, Y. Jung, D. Y. Choi, Y.-M. Park, and Y. T. Lim, Multivalent Polymer Nanocomplex Targeting Endosomal Receptor of Immune Cells

- for Enhanced Antitumor and Systemic Memory Response, *Angewandte Chemie*, 127, 8257–8261 (2015)
- [55] A. M. Krieg, Therapeutic Potential of Toll-Like Receptor 9 Activation, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 471–484 (2006)
- [56] Y. Ohya, S. Takeda, Y. Shibata, T. Ouchi, A. Kano, T. Iwata, S. Mochizuki, Y. Taniwaki, and A. Maruyama, Evaluation of Polyanion-coated Biodegradable Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles, *Journal of Controlled Release*, 155, 104–110 (2011)
- [57] K. Wang, G.-F. Luo, Y. Liu, C. Li, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo and X.-Z. Zhang, Redox-sensitive Shell Cross-linked PEG - Polypeptide Hybrid Micelles for Controlled Drug Release, *Polymer Chemistry*, 3, 1084–1090 (2012)
- [58] D. Zink, A. H. Fischer, and J. A. Nickerson, Nuclear Structure in Cancer Cells, *Nature Reviews Cancer*, 4, 677–687 (2004)
- [59] R. J DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, *Cell Metabolism*, 7, 11–20 (2008)
- [60] H. Li, X. Fan, and J. Houghton, Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 101, 805–815 (2007)
- [61] F. Mbeunkui, D. J. Johann, Cancer and the Tumor

- Microenvironment: A Review of an Essential Relationship, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64, 571–582 (2009)
- [62] F. R. Balkwill, M. Capasso, and T. Hagemann, The Tumor Microenvironment at a Glance, *Journal of Cell Science*, 125, 5591–5596 (2012)
- [63] N. E. Sounni, A. Noel, Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy, *Clinical Chemistry*, 59, 85–93 (2013)
- [64] I. F. Tannock, D. Rotin, Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation, *Cancer Research*, 49, 4373–4384 (1989)
- [65] L. E. Gerweck, K. Seetharaman, Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer, *Cancer Research*, 56, 1194–1198 (1996)
- [66] P. Swietach, R. D. Vaughan-Jones, A. L. Harris, and A. Hulikova, The Chemistry, Physiology and Pathology of pH in Cancer, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369 (2014)
- [67] Y.-R. Su, S.-H. Yu, A.-C. Chao, J.-Y. Wu, Y.-F. Lin, K.-Y. Lu, and F.-L. Mi, Preparation and Properties of pH-responsive, Self-assembled Colloidal Nanoparticles from Guanidine-containing Polypeptide and Chitosan for Antibiotic Delivery, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 494, 9–20 (2016)
- [68] C.-Y. Sun, Y. Liu, J.-Z. Du, Z.-T. Cao, C.-F. Xu, and J.

- Wang, Facile Generation of Tumor-pH-Labile Linkage-Bridged Block Copolymers for Chemotherapeutic Delivery, *Angewandte Chemie*, 55, 1010–1014 (2016)
- [69] A. J. Kirby, P. W. Lancaster, Structure and Efficiency in Intramolecular and Enzymic Catalysis. Catalysis of Amide Hydrolysis by the Carboxy-group of Substituted Maleamic Acids, *Royal Society of Chemistry*, 2, 1206–1214 (1972)
- [70] A. J. Kirby, R. S. McDonald, and C. R. Smith, Intramolecular Catalysis of Amide Hydrolysis by Two Carboxy-groups, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 12, 1495–1504 (1974)
- [71] S. Bosi, T. D. Ros, G. Spalluto, and M. Prato, Fullerene Derivatives: An Attractive Tool for Biological Applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 913 - 923 (2004)
- [72] Z. Chen, L. Ma, Y. Liu, and C. Chen, Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics, *Theranostics*, 2, 238–250 (2012)
- [73] M. D. Diener, J. M. Alford, and S. J. Kennel,  $^{212}\text{Pb}@C_{60}$  and its Water-soluble Derivatives: Synthesis, Stability, and Suitability for Radioimmunotherapy, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 5131–5138 (2007)
- [74] A. Carlsen, S. Lecommandoux, Self-assembly of Polypeptide-based Block Copolymer Amphiphiles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, 329–339 (2009)

- [75] X. Guan, Y. Li, A. Jiao, J. Chen, Z. Guo, and H. Tian, A pH-sensitive Charge-conversion System for Doxorubicin Delivery, *Acta Biomaterialia*, 9, 7672–7678 (2013)
- [76] A. K. Geim, K. S. Novoselov, The Rise of Graphene, *Nature Materials*, 6, 183–191 (2007)
- [77] G. Shim, M.-G. Kim, J. Y. Park, and Y.-K. Oh, Graphene-based Nanosheets for Delivery of Chemotherapeutics and Biological Drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, 205–227 (2016)
- [78] Q. Zhang, Z. Wu, N. Li, Y. Pu, B. Wang, T. Zhang, and J. Tao, Advanced Review of Graphene-based Nanomaterials in Drug Delivery Systems Synthesis, Modification, Toxicity and Application, *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1363–1375 (2017)
- [79] J. Luo, J. Kim, and J. Huang, Material Processing of Chemically Modified Graphene: Some Challenges and Solutions, *Accounts of Chemical Research*, 46, 2225–2234 (2013)
- [80] S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, and R. S. Ruoff, Graphene-based Composite Materials, *Nature*, 442, 282–286 (2006)
- [81] D. Li, M. B. Müller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace, Processable Aqueous Dispersions of Graphene Nanosheets, *Nature Nanotechnology*, 3, 101–105 (2008)

- [82] S. Stankovich, R. D. Piner, X. Chen, and R. Ruoff, Stable Aqueous Dispersions of Graphitic Nanoplatelets via the Reduction of Exfoliated Graphite Oxide in the Presence of Poly(sodium 4-styrenesulfonate), *Journal of Materials Chemistry*, 16, 155–158 (2006)
- [83] R. L. D. Whitby, Chemical Control of Graphene Architecture: Tailoring Shape and Properties, *ACS Nano*, 8, 9733–9754 (2014)
- [84] M. Orecchioni, R. Cabizza, A. Bianco, and L. G. Delogu, Graphene as Cancer Theranostic Tool: Progress and Future Challenges, *Theranostics*, 5, 710–723 (2015)
- [85] L. Feng, S. Zhang, and Z. Liu, Graphene Based Gene Transfection, *Nanoscale*, 3, 1252–1257 (2011)
- [86] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, Polysaccharides-based Nanoparticles as Drug Delivery Systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1650–1662 (2008)
- [87] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, and A. Bohn, Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angewandte Chemie*, 44, 3358–3393 (2005)
- [88] M. Hirrien, J. Desbrieres, and M. Rinaudo, Physical Properties of Methylcelluloses in relation with the Conditions for Cellulose Modification, *Carbohydrate Polymers*, 31, 243–252 (1996)
- [89] P. L. Nasatto, F. Pignon, J. L. M. Silveira, M. E. R. Duarte,

- M. D. Nosedá, and M. Rinaudo, Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications, *Polymers*, 7, 777–803 (2015)
- [90] L. A. L. Tang, J. Wang, and K. P. Loh, Graphene Based SELDI Probe with Ultrahigh Extraction and Sensitivity for DNA Oligomer, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 10976–10977 (2010)
- [91] Y. Wang, Z. Li, D. Hu, C. T. Lin, J. Li, and Y. Lin, Aptamer Graphene Oxide Nanocomplex for *in situ* Molecular Probing in Living Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 9274–9276 (2010)
- [92] A. Siriviriyanun, M. Popova, T. Imae, L. V. Kiew, C. Y. Looi, W. F. Wong, H. B. Lee, and L. Y. Chung, Preparation of Graphene Oxide–dendrimer Hybrid Carriers for Delivery of Doxorubicin, *Chemical Engineering Journal*, 281, 771–781 (2015)
- [93] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, and Z. Zhang, Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs, *Small*, 6, 537–544 (2010)
- [94] Z. Liu, J. T. Robinson, X. Sun, and H. Dai, PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-insoluble Cancer Drugs, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 10876–10877 (2008)
- [95] J. K. Kim, Y. W. Won, K. S. Lim, and Y. H. Kim,

- Low-molecular-weight Methylcellulose-based Thermo-reversible Gel/Pluronic Micelle Combination System for Local and Sustained Docetaxel Delivery, *Pharmaceutical Research*, 29, 525-534 (2012)
- [96] J. K. Kim, C. Yoo, Y. H. Cha, and Y. H. Kim, Thermo-reversible Injectable Gel Based on Enzymatically-chopped Low Molecular Weight Methylcellulose for Exenatide and FGF 21 Delivery to Treat Types 1 and 2 Diabetes, *Journal of Controlled Release*, 194, 316-322 (2014)
- [97] A. W. M. E. Naggar, M. M. Senna, T. A. Mostafa, and R. H. Helal, Radiation Synthesis and Drug Delivery Properties of Interpenetrating Networks (IPNs) Based on Poly(vinyl alcohol), Methylcellulose Blend Hydrogels, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1045-1051 (2017)
- [98] W. H. Daly, D. Poche, The Preparation of N-carboxyanhydrides of  $\alpha$ -amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate, *Tetrahedron Letters*, 29, 5859-5862 (1988)
- [99] S. Maddika, F. J. Mendoza, K. Hauff, C. R. Zamzow, T. Paranjothy, and M. Los, Cancer-selective Therapy of the Future: Apoptin and its Mechanism of Action, *Cancer Biology & Therapy*, 5, 10-19 (2006)
- [100] A. A. D. Oorschot, A. J. V. D. Eb, and M. H. Noteborn, The Chicken Anemia Virus-derived Protein Apoptin Requires Activation of Caspases for Induction of Apoptosis in Human Tumor Cells, *Journal of Virology*, 74, 7072-7078 (2000)



- [101] M. Los, S. Panigrahi. I. Rashedi, S. Mandal, J. Stetefeld, F. Essmann, and K. S. Osthoff, Apoptin, a Tumor-selective Killer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793, 1335–1342 (2009)
- [102] L. F. Feng, M. Zhong, X. Y. Lei, B. Y. Zhu, S. S. Tang, and D. F. Liao, Bcl-2 siRNA Induced Apoptosis and Increased Sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 Cells, *Journal of Drug Targeting*, 14, 21–26 (2006)
- [103] H. Kim, R. Namgung. K. Singha, I. K. Oh, and W. J. Kim, Graphene Oxide-polyethylenimine Nanoconstruct as a Gene Delivery Vector and Bioimaging Tool, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 2558–2567 (2011)
- [104] H. Kim, W. J. Kim, Photothermally Controlled Gene Delivery by Reduced Graphene Oxide-polyethylenimine Nanocomposite, *Small*, 10, 117–126 (2013)
- [105] Y. Robin,  $\alpha$ -Amino Acid N-Carboxy Anhydrides in Pharmaceutical Innovations: Try Them to Capture New Value, *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 26–31 (2015)
- [106] A. V. Harpe, H. Petersen, Y. Li, and T. Kissel, Characterization of Commercially Available and Synthesized Polyethylenimines for Gene Delivery, *Journal of Controlled Release*, 69, 309–322 (2000)
- [107] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated Gene Delivery Affects Endothelial Cell Function and Viability, *Biomaterials*, 22, 471–480 (2001)

- [108] M. L. Forrest, J. T. Koerber, and D. W. Pack, A Degradable Polyethylenimine Derivative with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery, *Bioconjugate Chemistry*, 14, 934–940 (2003)
- [109] K. Ryu, K. Kim, T. Kim, Synthesis and Characterization of Guanidinylated Polyethylenimine-conjugated Chitosan for Gene Delivery Systems, *Macromolecular Research*, 22, 264–271 (2014)
- [110] E. G. Bellomo, M. D. Wyrsta, L. Pakstis, D. J. Pochan and T. J. Deming, Stimuli-responsive Polypeptide Vesicles by Conformation-specific Assembly, *Nature Materials*, 3, 244–248 (2004)
- [111] J. Rodriguez-Hernandez and S. Lecommandoux, Reversible Inside–Out Micellization of pH-responsive and Water-Soluble Vesicles Based on Polypeptide Diblock Copolymers, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 2026–2027 (2005)
- [112] W. Dzwolak and P. E. Marszalek, Zipper-like Properties of [poly(L-lysine)+poly(L-glutamic acid)]  $\beta$ -pleated Molecular Self-assembly, *Chemical Communications*, 44, 5557–5559 (2005)
- [113] E. J. Bowman, A. Siebers, and K. Altendorf, Bafilomycins: A Class of Inhibitors of Membrane ATPase from Microorganisms Animal Cells and Plant Cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 7972–7976 (1988)

- [114] T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai, and Y. Tashiro, Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 17707–17712 (1991)
- [115] J. W. Wojtkowiak, D. Verduzco, K. J. Schramm, and R. J. Gillies, Drug Resistance and Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironment, *Molecular Pharmaceutics*, 8, 2032–2038 (2011)
- [116] Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda and Y. Baba, Acidic Extracellular Microenvironment and Cancer, *Cancer Cell International*, 13, 8 (2013)
- [117] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells, *Nature*, 411, 494–498 (2001)
- [118] G. J. Hannon, RNA interference. *Nature*, 418, 244 - 251 (2002)
- [119] J. Martinez, A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann, and T. Tuschl, Single-stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi, *Cell*, 110, 563 - 574 (2002)
- [120] B. U. Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko, and A. Aigner, RNAi-mediated Gene-targeting through Systemic Application of Polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*, *Gene Therapy*, 12, 461–466 (2005)

- [121] C. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. H. Boussard, H. Mcleod, T. E. Klein, and R. B. Altman, Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects, *Pharmacogenetics and Genomics*, 21, 440–446 (2011)
- [122] A. G. Hsieh, S. Korkut, C. Punct, and I. A. Aksay, Dispersion Stability of Functionalized Graphene in Aqueous Sodium Dodecyl Sulfate Solutions, *Langmuir*, 29, 14831–14838 (2013)
- [123] D. Nguyen, C. H. Such, and B. S. Hawckett, Polymer Coating of Carboxylic Acid Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes via Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Mediated Emulsion Polymerization, *Polymer Chemistry*, 51, 250–257 (2013)
- [124] V. T. Huynh, D. Nguyen, C. H. Such, and B. S. Hawckett, Polymer Coating of Graphene Oxide via Reversible Addition - fragmentation Chain Transfer Mediated Emulsion Polymerization, *Polymer Chemistry*, 53, 1413–1421 (2013)
- [125] S. Simoes, V. Slepishkin, P. Pires, R. Gaspar, M. C. Pedroso de Lima and N. Duzgunes, Human Serum Albumin Enhances DNA Transfection by Lipoplexes and Confers Resistance to Inhibition by Serum, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463, 459–469 (2000)
- [126] Eva Frei, Albumin Binding Ligands and Albumin Conjugate, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3, 4 (2011)
- [127] M. T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam and K. A.

- Howard, Albumin-Based Drug Delivery: Harnessing Nature to Cure Disease, *Molecular and Cellular Therapies*, 4, 12 (2016)
- [128] M. W. Amjad, M. C. I. M. Amin, H. Katas and A. M. Butt, Doxorubicin-loaded Cholic Acid-Polyethyleneimine Micelles for Targeted Delivery of Antitumor Drugs Synthesis, Characterization, and Evaluation of their in vitro Cytotoxicity, *Nanoscale Research Letters*, 7, 687 (2012)
- [129] I. Insua, A. Wilkinson, F. Fernandez-Trillo, Polyion Complex (PIC) Particles: Preparation and Biomedical Applications, *European Polymer Journal*, 81, 198–215 (2016)
- [130] V. Starchenko, M. Müller and N. Lebovka, Sizing of PDADMAC/PSS Complex Aggregates by Polyelectrolyte and Salt Concentration and PSS Molecular Weight, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, 14961–14967 (2012)

# Abstract

## Synthesis and Applications of Charge-Conversional Poly(ethylene imine)-Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid) Polymers for Gene and Drug Delivery Carriers

Kitae, Ryu

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering

The Graduate School

Seoul National University

In this study, PEI-poly(L-lysine)-poly(L-glutamic acid) (PLG) was synthesized by ring-opening polymerization using branched polyethyleneimine (PEI) as a macroinitiator and lysine N-carboxyanhydride (Lys-NCA), glutamic acid N-carboxyanhydride (Glu-NCA) as a monomer. PEI-Lys was composed of 51.8 Lys monomers per one PEI1.8k. PLG polymer was synthesized by addition of Glu-NCA from the primary amine of the PEI-Lys. We have investigated the pH responsive charge-conversional PLG polymers as gene and drug delivery system.

The chemical structures of PLG was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR. The number of Glu of PLG was 53.4, 75.9, 93.7 and 140.5, respectively. Hence, PLG polymers were named as PLG1.0, PLG1.5, PLG1.8 and

PLG2.7, based on the ratio of Glu to Lys. The PLG polymers showed good cytotoxicity at pH 7.4 and 6.0 regardless of serum proteins. The PLG polymers showed its own particle forming ability because of R groups of lysine and glutamic acid. Acid-base titration of PLG polymers showed increased buffering effect and  $pK_a$  values as the ratio of glutamic acid increased.

The PLG polymers were used in gene delivery systems. Among PLG1.5, PLG1.8 and PLG2.7, PLG1.8 polymer was the most suitable for gene delivery carriers. PLG1.8 showed up to 91.8 times increased transfection efficiency in the presence of serum proteins and slightly acidic conditions. Transfection experiments with bafilomycin A1 confirmed that endosomal escape is due to the proton sponge effect, which suggests that glutamic acid replaces the role of secondary and tertiary amines in PEI. In addition, the therapeutic gene, pJDK-apoptin and Bcl-2 siRNA, was used to confirm the apoptosis effect of cancer cells.

The PLG polymers were coated with PEI-rGO to impart pH-responsive charge conversion properties. This reduced graphene oxide-based drug delivery system was coated with PLG1.5 at a weight ratio of 30. PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX showed charge conversational properties according to pH conditions, and also it showed resistance to serum proteins compared to neat PEI-rGO. In addition, it showed improved cell permeability in slightly acidic condition with serum proteins by the flow cytometry results, therefore, PLG1.5 coated PEI-rGO/DOX represented enhanced apoptosis effect in the tumor acidic conditions according to the MTT experiments.

PEI conjugated methylcellulose (MCPEI) based doxorubicin delivery system was constructed with PLG1.0 and PLG2.7 which has a pH-responsive charge conversional property. The MCPEI-based DOX delivery system using PLG2.7 formed a PIC structure and it showed improved DOX release abilities compared to MCPEI/DOX and MCPEI+PLG1.0/DOX. The MTT experiment results of MCPEI+PLG2.7/DOX showed enhanced cell death properties in HeLa and A549 cells.

This study was carried out to investigate the effects of pH-responsive charge conversional polymers on the gene delivery systems and PEI-rGO, MCPEI based drug delivery systems. This can be expected to contribute to the development of “smart” gene and drug delivery vehicles that are sensitive to specific environments.

---

***Keywords*** : Charge conversional polymer, pH-responsive, Gene delivery system, Drug delivery system, Graphene oxide, Methylcellulose

***Student Number*** : 2013-30340



